

**Quantifizierung und Charakterisierung von Phytoplankton
mit der FlowCAM-Methode im Vergleich zur Mikroskopie**

Diplomarbeit

von

Paul S. Rzepka

Betreuer:

Prof. Dr. Ulf Riebesell

Kiel, Juli 2010

Zusammenfassung

Quantifizierung und Charakterisierung von Phytoplankton-Organismen können Erkenntnisse über marine Nahrungsnetze, von der Fischerei genutzte Ressourcen und den globalen Kohlenstoffhaushalt liefern. Automatisierte Verfahren zur Analyse von Phytoplankton-Organismen können verschiedene Vorteile - wie beispielsweise hohe Präzision und Akkuratez oder Aufwandsersparnis - bieten. Die FlowCam ist ein methodischer Ansatz zur automatisierten Analyse von Phytoplankton-Organismen, der Aspekte der Mikroskopie und der Flowcytometrie vereint.

In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit sich die FlowCam zur Analyse von Phytoplankton-Organismen im Vergleich zu anderen Methoden - wie beispielsweise der Mikroskopie - eignet. Dazu wurden Vergleichsmessungen mit der FlowCam, dem Durchlichtmikroskop und dem Coulter Counter an Eichpartikeln, Coccolithophoriden-Zellen und Diatomeen verschiedener Gattungen durchgeführt.

Sphärische Partikel wie beispielsweise Coccolithophoriden-Zellen können mit der FlowCam akkurat und präzise vermessen werden. Komplexere Formen von Partikeln, wie z.B. Ketten von Diatomeen-Zellen, konnten nicht ausreichend akkurat vermessen werden. Die Möglichkeit, mit der FlowCam Phytoplankton-Organismen automatisch zu identifizieren, konnte für kettenbildende Diatomeen nicht als anwendbar evaluiert werden. Partikelkonzentrationen können mit der FlowCam nur unter Einhaltung bestimmter Vorgehensweisen bei den Messungen akkurat bestimmt werden.

Neben den beschriebenen Untersuchungen wurde im Zuge dieser Diplomarbeit mit Hilfe der FlowCam eine Methode zur automatischen Bestimmung der Sinkgeschwindigkeit von Partikeln entwickelt. Diese Methode konnte für Zellen der Coccolithophoride *Emiliania huxleyi* als anwendbar und ausreichend akkurat evaluiert werden.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	5
1.1	Phytoplankton.....	5
1.2	Methoden zur Partikelanalyse	7
1.3	Beschreibung zweier Funktionsprinzipien	11
1.3.1	Das Coulter-Prinzip (Coulter, 1957)	11
1.3.2	Aufbau und Funktionsweise der FlowCam.....	12
	a) Probeneinheit	12
	b) Optische Einheit	12
	c) Elektronische Einheit.....	15
2.	Material und Methoden.....	17
2.1	Größenmessungen	17
2.1.1	Vermessung standardisierter Mikrosphären:.....	17
2.1.2	Vermessung von Coccolithophoriden-Zellen.....	20
2.1.3	Volumina von Phytoplankton-Partikeln.....	22
2.2	Automatische Identifizierung von Phytoplankton-Partikeln.....	23
2.3	Bestimmungen von Partikelkonzentrationen	24
2.3.1	Sedimentationsfehler	24
2.3.2	Aufkonzentrieren von Proben	25
2.3.3	Vergleich zwischen FlowCam und Durchlichtmikroskop	26
2.4	Sinkgeschwindigkeit von Coccolithophoriden (<i>Emiliania huxleyi</i>).....	28
3.	Ergebnisse	30
3.1	Größenmessungen	30
3.1.1	Standardisierte Mikrosphären	30
3.1.2	Coccolithophoriden (<i>Emiliania huxleyi</i>)	32
3.1.3	Volumina von Phytoplankton-Partikeln.....	34
3.2	Automatische Identifizierung von Phytoplankton-Partikeln.....	35
3.3	Bestimmungen von Partikelkonzentrationen	37
3.3.1	Sedimentationsfehler	37
3.3.2	Aufkonzentrieren von Proben	39
3.3.3	Vergleich zwischen FlowCam und Durchlichtmikroskop	40
3.4	Sinkgeschwindigkeit von Coccolithophoriden (<i>Emiliania huxleyi</i>).....	41

4.	Diskussion.....	44
4.1	Größenmessungen	44
4.1.1	Messung von Größenstandards	44
4.1.2	Vermessung von Coccolithophoriden (<i>Emiliana huxleyi</i>)	47
4.1.3	Volumina von Phytoplankton-Zellen	50
4.2	Automatische Identifizierung von Phytoplankton-Partikeln.....	52
4.3	Bestimmungen von Partikelkonzentrationen	54
4.3.1	Sedimentation von Partikeln	54
4.3.2	Aufkonzentrieren von Proben	55
4.3.3	Vergleich von Durchlichtmikroskopie und FlowCam	56
4.4	Bestimmung der Sinkgeschwindigkeit von Coccolithophoriden (<i>Emiliana huxleyi</i>).....	59
5.	Literaturverzeichnis	62
6.	Anhang.....	65

1. Einleitung

1.1 Phytoplankton

Die Quantifizierung und Charakterisierung von ozeanischen Phytoplankton-Organismen kann Erkenntnisse über marine Nahrungsnetze, von der Fischerei genutzte Ressourcen und den globalen Kohlenstoffhaushalt liefern. Wie weithin bekannt ist, bauen Phytoplankton-Organismen über oxygene Photosynthese und mit Hilfe anorganischer Nährstoffe Biomasse auf. Der Aufbau von Biomasse mit Hilfe anorganischer Nährstoffe wird als Primärproduktion bezeichnet. Der Aufbau von Biomasse über die oxygene Photosynthese (pflanzliche Primärproduktion) macht den größten Anteil der globalen Primärproduktion (aquatisch und terrestrisch) aus.

Obwohl die Biomasse ozeanischer Primärproduzenten nur einen Anteil von weniger als 1 Prozent an der weltweit durch Primärproduzenten aufgebauten Biomasse hat (Falkowski, Barber und Smetacek, 1998; Antoine, Andre und Morel, 1996), wird der ozeanischen Netto-Primärproduktion (Differenz aus Primärproduktion und Respiration) etwa die Hälfte der globalen Netto-Primärproduktion (ca. 105 [Pg C / Jahr]) zugeschrieben (Field, Behrenfeld, Randerson und Falkowski, 1998).

Die ozeanischen Primärproduzenten (Phytoplankton und Bakterien) stellen einen wichtigen Teil mariner Nahrungsnetze dar. Eines der als weltweit am produktivsten angesehenen marinen Ökosysteme, der Antarktische Ozean (Busalacchi, 2004), wird entscheidend vom Phytoplankton mit beeinflusst. Höhere trophische Ebenen wie planktivore Organismen sind hier entscheidend von der Größe und Zusammensetzung der Phytoplankton-Populationen abhängig (*bottom-up control*) (Smith Jr. und Lancelot, 2004). Die aus den Veränderungen der ozeanischen Primärproduktion resultierenden Effekte auf marine Ökosysteme können sich unter Umständen bis hin zu durch den Menschen genutzten ozeanischen Ressourcen - wie kommerziell befischte Bestände von Meeresorganismen – bemerkbar machen (Brown et al., 2010).

Durch die Verbrennung fossiler Biomasse und dem damit verbundenen Ausstoß von CO₂ in die Atmosphäre nimmt der Mensch unter anderem auch Einfluss auf die ozeanischen Primärproduzenten. In den der Industrialisierung vorangegangenen

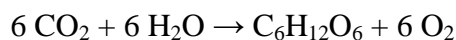
10.000 Jahren betrug die CO₂-Konzentration in der Atmosphäre nie über 285 [ppm] (Indermühle et al., 1999). Im Jahr 2005 wurde ein Anstieg der atmosphärischen CO₂-Konzentration auf bereits 380 [ppm] dokumentiert (Keeling und Whorf, 2005). Bei atmosphärischen CO₂-Konzentrationen höher als in der Oberflächenschicht des Ozeans diffundiert CO₂ abhängig von der Stärke des Konzentrationsgradienten in die Oberflächenschicht des Ozeans.

$$[\text{CO}_2]_{\text{Diffusion}} = k_{\text{CO}_2} * ([\text{CO}_2]_{\text{Atmosphäre}} - [\text{CO}_2]_{\text{Ozean}})$$

(Vereinfachte Gleichung für die Diffusion von CO₂;

k_{CO_2} = Gasaustausch-Koeffizient für CO₂)

Die atmosphärische CO₂-Konzentration wirkt sich also auch direkt auf die CO₂-Konzentration in der Oberflächenschicht des Ozeans aus und umgekehrt. Durch die oxygene Photosynthese von aquatischen Primärproduzenten (Phytoplankton) wird im Wasser gelöstes CO₂ verbraucht.

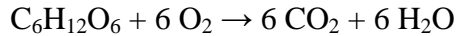


(Vereinfachte Reaktionsgleichung der oxygenen Photosynthese)

Mesokosmenexperimente haben gezeigt, dass die Netto-Primärproduktion einer Phytoplanktongemeinschaft bei erhöhten CO₂-Konzentrationen (z.B. 710 [ppm]) signifikant höher ist als bei niedrigeren Konzentrationen (z.B. 190 [ppm]). Außerdem wurden mit steigenden CO₂-Konzentrationen Verschiebungen in der Zusammensetzung der Phytoplanktongemeinschaft festgestellt (Riebesell, 2004).

Da die oxygene Photosynthese CO₂ verbraucht und CO₂ zwischen dem Oberflächenwasser und der Atmosphäre ausgetauscht wird, haben aquatische Primärproduzenten direkten Einfluss auf die atmosphärische CO₂-Konzentration. Im Wasser gelöstes CO₂ wird durch Photosynthese aquatischer Phytoplankton-Organismen (und Bakterien) in partikuläres organisches Material (POM) bzw. partikulären organischen Kohlenstoff (POC) umgewandelt (Primärproduktion). POM bzw. POC beschreiben sowohl lebende als auch tote organische Partikel. Der größte Teil des

partikulären organischen Kohlenstoffs (POC) wird im Oberflächenozean über Respiration remineralisiert.



(Vereinfachte Reaktionsgleichung der Respiration)

Die Respiration setzt CO_2 frei. Sie ist also eine Umkehrung der Photosynthese. Etwa ein Fünftel des im Oberflächenozean produzierten POC wird jedoch durch verschiedene Prozesse – wie beispielsweise die Sedimentation - in tiefere Wasserschichten transportiert. Die Formierung von Aggregaten oder Ballastmaterialien begünstigt die Sedimentation von POC. Der Abtransport von CO_2 über die Formierung von POC durch Primärproduzenten aus dem Oberflächenozean wird als „Biologische Pumpe“ bezeichnet (Volk und Hoffert, 1985). Ozeanische Primärproduzenten (Phytoplankton und Bakterien) haben also das Potential, CO_2 aus dem Oberflächenozean und damit aus der Atmosphäre zu entfernen. Jüngste Studien haben gezeigt, dass die Photosynthese aquatischer Primärproduzenten im Zusammenspiel mit chemischen und hydrologischen Faktoren etwa 10 Prozent der anthropogenen CO_2 -Emissionen aus der Atmosphäre entfernt (Liu, Dreybrodt und Wang, 2010).

Aufgrund der beschriebenen Bedeutungen von Phytoplankton-Organismen für marine Ökosysteme und den globalen CO_2 -Haushalt kann die Quantifizierung und Charakterisierung von Phytoplankton-Organismen (z.B. Bestimmung der Biomasse und der Sinkgeschwindigkeit) weitreichende Erkenntnisse liefern. Für die Untersuchung von Phytoplankton-Organismen kann sich verschiedener manueller und automatisierter Methoden bedient werden.

1.2 Methoden zur Partikelanalyse

Bereits um 1700 entdeckte A. van Leeuwenhoek einzellige Bakterien und Protozoen mit Hilfe eines Mikroskops mit nur einer Linse. Das erste Mikroskop zur Vermessung von Objekten wurde 1768 beschrieben. M. F. d'Albert d'Ailly erweiterte ein optisches Mikroskop um eine Skala bzw. ein Fadenkreuz im Okular und einen XY-Tisch zur Messung von Strecken.

Um 1873 erarbeitete Ernst Abbe die bis heute geltenden physikalischen Grundlagen zur Herstellung von Lichtmikroskopen, deren maximale Auflösung nicht von der Qualität der Linsen, sondern von der Wellenlänge des verwendeten Lichts abhängt.

Abbesche Auflösungsgrenze:

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2 \cdot NA}$$

d = Distanz zweier getrennt voneinander wahrnehmbarer Punkte

λ = Wellenlänge des Lichts

NA = numerische Apertur

Für die Wellenlängen des sichtbaren Lichts von ca. 400 bis 700 [nm] ergibt sich eine maximale Auflösung von ca. 0,3 [μ m].

Auflichtmikroskope eignen sich für die Betrachtung undurchsichtiger Präparate; durchsichtige Präparate können mit Durchlichtmikroskopen betrachtet werden. Bei inversen Durchlichtmikroskopen ist das Objektiv unter dem Tisch angebracht. Der vergrößerte Abstand zwischen der Lichtquelle und dem Präparat ermöglicht die Betrachtung von Präparaten mit größerer Dicke, wie z.B. Kulturgefäßen oder Sedimentationskammern.

Heute werden zur Quantifizierung und Charakterisierung von Partikeln neben der Mikroskopie noch weitere methodische Ansätze angewendet. Vor allem Verfahren zur automatisierten Zählung und Charakterisierung von Partikeln sind für Untersuchungen von Proben von großem Interesse. Automatische Partikelanalysen können den Zeitaufwand bei der Untersuchung von Proben entscheidend minimieren (Sieracki, Sieracki und Yentsch, 1998). Darüber hinaus sind automatisierte Verfahren sehr präzise und unter Umständen wesentlich akkurater als manuelle Verfahren. Beispielsweise können bei der Zählung aerober anoxygener phototropher Bakterien unter Verwendung eines Epifluoreszenzmikroskops durch Verwechslungen mit Cyanobakterien Überschätzungen der Abundanz von bis zu 30 Prozent ent-

stehen. Durch die Verwendung eines Flowcytometers mit spezifischen Detektoren wurde dieser Fehler ausgeschlossen (Zhang und Jiao, 2004).

W. H. Coulter beschrieb 1957 ein Verfahren zur automatisierten Zählung und Vermessung von Partikeln, das Coulter-Prinzip (siehe 1.3.1). Nach diesem Prinzip wurden verschiedene Geräte zur automatisierten Partikelanalyse – wie z.B. der Coulter Counter – entwickelt. Im medizinischen Bereich wurde der Coulter Counter aufgrund seiner hohen Präzision als Kalibrierungsverfahren für die Zählung von Blutzellen evaluiert (Peng, Wang und Bai, 2007).

Sowohl Flowcytometer als auch Coulter Counter wurden in der biologischen Meereskunde beispielsweise zur Bestimmung von Phytoplankton-Abundanzen und Zellgrößen eingesetzt (Engel, Schulz, Riebesell, Bellerby, Delille und Schartau, 2008; Moreira-Turcq, Cauwet und Martin, 2001).

In den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde eine Methode entwickelt, die Aspekte der Mikroskopie und der Flowcytometrie vereint: die FlowCam. Die FlowCam wurde ursprünglich für die Analyse von Mikroplankton-Zellen (20 bis 200 μm) in Kulturen und natürlichen Populationen entwickelt (Sieracki et al., 1998) und fand seither verschiedene Anwendungsgebiete. Die FlowCam wurde für die Bestimmung von Nanoplankton-Abundanzen (See, Campbell, Richardson, Pickney und Shen, 2005) und Ingestionsraten von Copepoden (Ide, Takahashi, Kuwata, Nakamachi und Saito, 2008) sowie zur Charakterisierung von Sediment-Öl-Aggregaten in Gewässern (Sterling Jr., Bonner, Ernest, Page und Autenrieth, 2004) eingesetzt.

Neben der Bestimmung von Zellgrößen und der Abundanz von Planktonorganismen kann die Bestimmung der Biomasse interessante Erkenntnisse liefern (siehe 1.1). Die Biomasse von Planktonorganismen kann beispielsweise als Kohlenstoffgehalt pro Zelle ausgedrückt werden. Der Kohlenstoffgehalt pro Zelle lässt sich anhand des Zellvolumens mit Hilfe spezifischer Faktoren manuell berechnen (Menden-Deuer und Lessard, 2000). Das Zellvolumen kann anhand artspezifischer, dreidimensionaler, geometrischer Formen manuell berechnet werden (Hillebran,

Dürselen, Kitschel, Pollinger und Zohary, 1999). Bei der Untersuchung von Planktonorganismen mit der FlowCam werden Volumina anhand der gemessenen Größen automatisch berechnet. Bei der FlowCam liegen der Berechnung von Volumina keine partikelspezifischen dreidimensionalen geometrischen Formen zugrunde. Volumina werden hier anhand der zweidimensionalen Ausdehnung eines Partikels und des Volumens einer theoretischen Kugel mit gleicher zweidimensionaler Ausdehnung berechnet.

Die Sinkgeschwindigkeit von Planktonpartikeln stellt im Kontext mit der „Biologischen Pumpe“ (siehe 1.1) einen interessanten Parameter dar. Zur Bestimmung der Sinkgeschwindigkeit wurden bereits verschiedene Verfahren eingesetzt. Beispielsweise wurde die Sinkgeschwindigkeit von Coccolithophoriden-Zellen (*Emiliana huxleyi*) über das Stokessche Gesetz errechnet (Paasche, 2002). Bei der Berechnung der Sinkgeschwindigkeit von Partikeln mit langsamen Sinkgeschwindigkeiten ($Re < 1$) errechnet sich die Sinkgeschwindigkeit anhand des Partikelradius, der Dichte des Partikels und der Eigenschaften des umgebenden Fluids.

$$v_p = \frac{2r^2g(\rho_p - \rho_f)}{9\eta}$$

(v_p = Sinkgeschwindigkeit; r = Partikelradius; g = Erdbeschleunigung; ρ_p = Dichte des Partikels; ρ_f = Dichte des Mediums; η = Viskosität des Mediums)

In einer weiteren Studie wurden Aggregate der Coccolithophoride *Emiliana huxleyi* in Kultur mit Hilfe einer digitalen Kamera während des Absinkens gefilmt und die Sinkgeschwindigkeit mit Hilfe von Videoverarbeitungssoftware bestimmt (Biermann und Engel, 2010).

Im Zuge der hier vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe der FlowCam eine weitere Methode entwickelt, mit der sich die Sinkgeschwindigkeit von Planktonpartikeln direkt messen lässt. Anhand von Messungen der Sinkgeschwindigkeit von Coccolithophoriden-Zellen (*Emiliana huxleyi*) und durch den Vergleich mit Daten aus

früheren Studien (Paasche, 2002) konnte diese Methode als anwendbar evaluiert werden.

Welche Methode sich für die Untersuchung von Planktonpartikeln am besten eignet, ist von den zu untersuchenden Partikeln und der Fragestellung abhängig. Beispielsweise lassen sich mit dem Coulter Counter (Z2) nach Herstellerangaben Partikel in einem Größenbereich von 1 bis 120 [μm] Durchmesser zählen und vermessen. Mit einem einfachen Durchlichtmikroskop können z.B. einzelne Phytoplankton-Arten vom Benutzer voneinander unterschieden werden.

In den Studien zu dieser Arbeit sollte überprüft werden, inwiefern sich die FlowCam für die automatisierte Untersuchung von Phytoplankton-Partikeln eignet und welche Vor- bzw. Nachteile sich im Vergleich mit anderen Methoden - wie der Durchlichtmikroskopie und dem Coulter Counter - zeigen.

1.3 Beschreibung zweier Funktionsprinzipien

1.3.1 Das Coulter-Prinzip (Coulter, 1957)

Mit dem Coulter Counter können ausschließlich Proben von Elektrolytlösungen (z.B. Seewasser) untersucht werden. Dabei werden ein Röhrchen mit einer kleinen Öffnung (Apertur) und zwei Elektroden - eine innerhalb des Röhrchens, eine außerhalb - in die Probe getaucht. Sobald eine elektrische Spannung angelegt wird, entsteht in der Elektrolytlösung ein Stromfluss zwischen den Elektroden. Der Widerstand des Elektrolyts zwischen den Elektroden wird gemessen. Die Probe wird durch die Apertur aus dem Gefäß in das Röhrchen gesaugt. Passiert ein Partikel die Apertur, verdrängt er ein bestimmtes Volumen der Elektrolytlösung, was zu einer kurzzeitigen Veränderung des elektrischen Widerstands an der Apertur führt. Diese Veränderung wird gemessen. Die Größe der Veränderung des Widerstandes ist proportional zur Masse des Partikels. So kann das Volumen eines Partikels vom Coulter Counter bestimmt werden. Die Partikelkonzentration der Probe ergibt sich aus der Anzahl von Ereignissen (Veränderung des Widerstandes) und dem gemessenen Probenvolumen, das durch das Röhrchen gesaugt wurde.

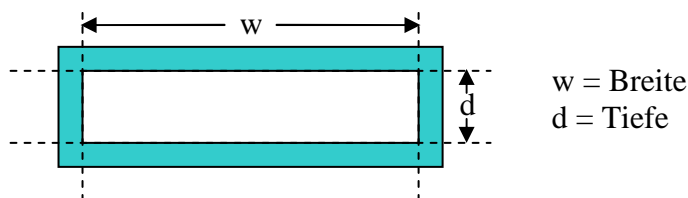
1.3.2 Aufbau und Funktionsweise der FlowCam

Die FlowCam vereint Aspekte eines Flowcytometers mit denen eines Lichtmikroskops. Mit der FlowCam lassen sich in einem flüssigen Medium suspendierte Partikel zählen, vermessen und charakterisieren. Das Gerät besteht aus drei technischen Untereinheiten: Einer mechanischen Probeneinheit zum Transport der zur untersuchenden Flüssigkeit, einer optischen zur Aufnahme der Daten und einer elektronischen Einheit für die Datenverarbeitung.

a) Probeneinheit

Die Probeneinheit dient dazu, die zu untersuchende Flüssigkeitsprobe gleichmäßig durch eine quaderförmige Glasküvette zu führen. Während die Probe die Glasküvette passiert, werden durch verschiedene optische Verfahren Daten der zu analysierenden Probe gesammelt.

Die Probe wird in einen Trichter gegeben, der über einen Schlauch mit der quaderförmigen Glasküvette verbunden ist. Mittels einer Peristaltikpumpe wird die zu untersuchende Probe durch die Glasküvette gesaugt. Alternativ kann die Probe auch ohne Verwendung des Trichters durch den Schlauch direkt aus einem Probengefäß in die Küvette gesaugt werden. Die Pumpgeschwindigkeit kann vom Benutzer verändert werden, um den Durchfluss der Probe so anzupassen, dass die Bewegungsunschärfe der erzeugten Bilder möglichst klein ist. Die Größe der verwendeten Küvette wird dem Größenspektrum der zu untersuchenden Partikel entsprechend gewählt, wobei die Tiefe der Küvette (d) als kleinstes Maß ausschlaggebend ist.



b) Optische Einheit

Die optische Einheit dient dazu, die in der Küvette befindliche Probe zu beleuchten, zu vergrößern und die optischen Signale an die Messinstrumente (digitale Kamera, Fluoreszenzdetektoren) weiterzuleiten. Die optische Einheit umfasst die Lichtquellen, Objektive und Linsen, verschiedenen Spiegel und Filter sowie eine digitale Kamera und zwei Fluoreszenz-Detektoren.

Zur Beleuchtung einer Probe dienen zwei Lichtquellen, eine Leuchtdiode (LED) [1] und ein Grün-Laser (15 [mW]; 532 [nm]) [2]. Der Weg des Lichtes wird im Folgenden von der Quelle zum Detektor entlang der optischen Achse des Gerätes beschrieben.

Die Leuchtdiode emittiert Licht in die Glasküvette [3] und die darin befindliche Probe. Das hinter der Küvette austretende Licht strahlt dann durch ein Objektiv [4]. Das Objektiv ist austauschbar und kann je nach Größe der zu untersuchenden Partikel und der entsprechenden Küvette mit Vergrößerungen von 2x, 4x, 10x oder 20x gewählt werden. Werden die Objektive mit 10x oder 20x Vergrößerung gewählt, muss zwischen der Leuchtdiode und dem Objektiv ein entsprechender Kollimator installiert werden. Der Kollimator fokussiert bzw. streut das Licht und erhöht so die Bildqualität.

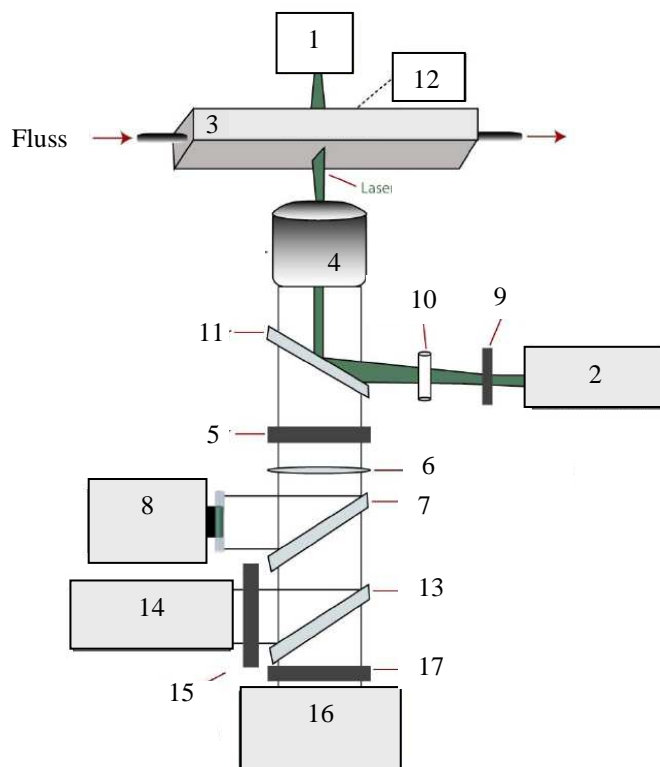
Hinter dem Objektiv passiert das Licht einen Emissionsfilter [5] und eine Linse [6], die die Tiefenschärfe erhöhen soll. Dann wird das Licht von einem halbdurchlässigen Spiegel [7] im 90°-Winkel in die Optik der digitalen Kamera [8] reflektiert. Der Weg des von der Leuchtdiode emittierten Lichts entlang der optischen Achse der FlowCam ist dem Weg des Lichts in einem Durchlichtmikroskop also weitestgehend analog. Die Lichtemission der Leuchtdiode erfolgt in kurzen Intervallen (Blitzen). Die Länge der Intervalle und der Abstand zwischen den Intervallen sind mit der Verschlusszeit und der Bildrate der Kamera gekoppelt und können vom Benutzer verändert werden. Außerdem hat der Benutzer die Möglichkeit, regelmäßig getaktete Intervalle von Lichtemissionen der Leuchtdiode bei regelmäßiger Bildrate

der Kamera zu wählen oder die Leuchtdiode und die Kamera werden durch einen Laserstreuungsdetektor [12] ausgelöst.

Der Grün-Laser ist senkrecht zur optischen Achse der FlowCam angeordnet. Der Strahlengang verläuft über einen Filter [9] und eine zylindrische Linse [10] auf einen dichromatischen Spiegel [11], der Wellen-Längen ≤ 532 [nm] reflektiert. Die zylindrische Linse [10] fächert den Laserstrahl und der dichromatische Spiegel [11] reflektiert den Strahl im 90° -Winkel auf die optische Achse. Dann strahlt der gefächerte Laserstrahl durch das Objektiv [4] und die dahinter befindliche Küvette [3]. Der Laserstrahl, der die Küvette [3] und die darin enthaltene Probe passiert hat, trifft auf einen Streuungsdetektor [12], der Störungen durch in der Probe befindliche Partikel des vom Laser emittierten Lichts detektiert.

Passiert ein Partikel den Laserstrahl kann dieser zur Fluoreszenzemission angeregt werden. Diese Fluoreszenzemission der Partikel fällt durch das Objektiv [4] und trifft dahinter auf den dichromatischen Spiegel [11]. Da die Wellenlängen der Fluoreszenz immer größer sind als die des anregenden Lasers, wird das Fluoreszenzlicht nicht vom dichromatischen Spiegel [11] reflektiert, sondern durchstrahlt diesen. Dahinter passiert das Fluoreszenzlicht den Emissionsfilter [5] und die Linse zur Erhöhung der Tiefenschärfe [6] und trifft auf den halbdurchlässigen Spiegel [7], der einen Teil des auftreffenden Lichts im 90° -Winkel in die Optik der digitalen Kamera [8] reflektiert.

Der Teil des Lichts, der den halbdurchlässigen Spiegel durchdringt, wird dann von einem weiteren dichromatischen Spiegel [13] in Wellenlängen von ≤ 600 [nm] und >600 [nm] aufgespaltet. Wellenlängen von ≤ 600 [nm] werden im 90° -Winkel in einen Fluoreszenzdetektor [14] reflektiert, dem ein 575nm-Filter [15] vorgelagert ist. Wellenlängen von >600 [nm] strahlen durch den dichromatischen Spiegel [13] in einen zweiten Fluoreszenzdetektor [16], dem ein 660nm-Filter [17] vorgelagert ist. Bei den Fluoreszenzdetektoren handelt es sich um Sekundärelektronenvervielfältiger (*photo multiplier tube* PMT). Alle dichromatischen Spiegel sowie der 575nm-Filter sind austauschbar und können an die Bedürfnisse des Benutzers angepasst werden.



Schematische Darstellung der FlowCam (FluidImaging Tech., USA)

c) Elektronische Einheit

Die elektronische Einheit dient als Bindeglied zwischen der optischen Einheit und dem Datenverarbeitungsprogramm der FlowCam. Die elektronische Einheit umfasst einen PMT- und Laserstreuungssignalprozessor verbunden mit einem Computer.

Werden von einem der Fluoreszenzdetektoren oder dem Laserstreuungsdetektor optische Signale eines Partikels empfangen, so werden diese an den Prozessor weitergeleitet. Der Prozessor verarbeitet die Signale und gliedert sie in das Datenverarbeitungsprogramm ein. Gleichzeitig werden Signale des Laserstreuungsdetektors vom Prozessor an die digitale Kamera weitergeleitet. Empfängt die Kamera ein solches Signal, wird ein digitales Bild des von der Optik erfassten Partikels erzeugt und an den Computer gesendet. Dieses Auslöseverfahren wird mit *scatter*-Modus bezeichnet. Im *auto*-Modus erzeugt die digitale Kamera unabhängig vom Laserstreuungsdetektor Bilder in regelmäßigen Abständen. Die Erkennung eines Partikels erfolgt hier durch Veränderungen des Bildhintergrunds. Der Modus

der Bilderzeugung und der zeitliche Abstand zwischen den Bilderzeugungen im *auto*-Modus werden vom Benutzer bestimmt. Das Bild jedes Partikels kann immer vom Benutzer auf dem Bildschirm betrachtet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Größenmessungen

2.1.1 Vermessung standardisierter Mikrosphären

Als Größenstandard wurden standardisierte Mikrosphären aus Polystyren (Fluid-Imaging Tech., USA) der Größen 10 [µm], 20 [µm] und 50 [µm] verwendet. Die kalibrierten Mikrosphären wurden in künstlichem Seewasser suspendiert. Das verwendete künstliche Seewasser wurde zuvor mit Hilfe einer elektrischen Vakuumpumpe bei -200 [mbar] durch einen Filter mit einer Porenweite von 0,2 [µm] (Bottletop Filter, Sarstedt, Deutschland) filtriert. Alle Größenstandards wurden mittels eines Coulter Counters (Z2 Coulter Particle Counter and Analyzer, Beckman Coulter, USA), eines Durchlichtmikroskops (Zeiss Axiovert 100, Carl Zeiss AG, Deutschland) sowie einer FlowCam (Portable FlowCam, FluidImaging Tech., USA) vermessen. Die mittels der drei Methoden bestimmten Durchmesser für alle vermessen Größen der standardisierten Mikrosphären wurden mit der jeweiligen nominalen Größe der Mikrosphären verglichen.

Coulter Counter:

Für die Vermessung der Mikrosphären mit dem Coulter Counter wurden je 15 [ml] der Mikrosphärensuspension jeder Größe in einen Messbehälter (Beckman Coulter, USA) überführt. Für jede verwendete Größe von Mikrosphären wurden fünf Messwiederholungen durchgeführt. Für jede Messwiederholung wurde ein Stichprobenvolumen von 0,5 [ml] eingestellt. Vor jeder Messung wurde der Coulter Counter mit destilliertem Wasser gespült. Für die Vermessung der 10 [µm] großen Mikrosphären wurde ein Messbereich von 5 [µm] bis 15 [µm] eingestellt, für die Vermessung der 20 [µm] großen Mikrosphären ein Messbereich von 10 [µm] bis 30 [µm], und für 50 [µm] große von 30 [µm] bis 70 [µm]. Die durch den Coulter Counter ermittelten Größen wurden als mittlerer Durchmesser [µm] mit der dazugehörigen Standardabweichung [µm] ausgegeben.

Durchlichtmikroskop:

Für die Vermessung der kalibrierten Mikrosphären der Größen 10 [µm], 20 [µm] und 50 [µm] mit dem Durchlichtmikroskop wurde jeweils eine Objektkammer mit den verwendeten Mikrosphärensuspensionen gefüllt und mit einem Deckglas luftdicht verschlossen.

Bei der Vermessung der 10 [µm] großen Mikrosphären wurden ein Objektiv mit 100-facher Vergrößerung und ein Messokular mit 10-facher Vergrößerung verwendet. Somit ergab sich eine 1000-fache Gesamtvergrößerung. Die 20 [µm] großen sowie die 50 [µm] großen Mikrosphären wurden mit Hilfe eines Objektivs mit 40-facher und eines Messokulars mit 10-facher Vergrößerung vermessen. Dies entspricht einer 400-fachen Gesamtvergrößerung. Der Abstand zwischen den Teilstrichen der verwendeten Messskala wurde mit Hilfe eines Eichstandards bestimmt. Bei 1000-facher Gesamtvergrößerung entspricht der Abstand zwischen zwei Teilstrichen der verwendeten Messskala 1,14 [µm], bei 400-facher Gesamtvergrößerung 2,45 [µm].

Für jede verwendete Größe wurden 20 einzelne Mikrosphären fokussiert und ihr Durchmesser mit Hilfe des Messokulars ermittelt. Die auf der Skala des Messokulars abgelesene Anzahl von Teilstrichen wurde dann mit dem zuvor bestimmten Abstand pro Teilstrich [µm] bei entsprechender Vergrößerung multipliziert.

$$D = N * k$$

(D = Durchmesser; N = Anzahl der Teilstriche; k = konstanter Abstand der Teilstriche)

Für 10 [µm] große Mikrosphären wurde bei gleicher Vorgehensweise zusätzlich ein Stichprobenumfang von n = 100 vermessen.

FlowCam:

Für die Vermessung der standardisierten Mikrosphären der Größen 10 [µm], 20 [µm] und 50 [µm] mittels der FlowCam wurden Probevermessungen aller verwendeten Größen von standardisierten Mikrosphären durchgeführt und die FlowCam anhand der gemessenen Größen kalibriert.

Für die Vermessung der 10 [µm] und 20 [µm] standardisierten Mikrosphären wurden eine Küvette mit einer Tiefe von $d = 50$ [µm] und das Objektiv mit 20-facher optischer Vergrößerung verwendet. Der entsprechende Kollimator wurde vor der Leuchtdiode installiert. Bei der Vermessung der 50µm-Mikrosphären wurde eine Küvette der Tiefe $d = 300$ [µm] und das Objektiv mit 10-facher optischer Vergrößerung gewählt. Der entsprechende Kollimator wurde auch hier installiert. Die optimalen Einstellungen des durch die Kamera erzeugten Hintergrundbildes wurden für die verschiedenen optischen Vergrößerungen den Herstellerangaben entsprechend vorgenommen (siehe Anhang, S. 65).

Der Größenmessbereich wurde für 10µm-Mikrosphären auf 5 [µm] bis 15 [µm] und für 20µm-Mikrosphären auf 10 [µm] bis 30 [µm] festgelegt. Für 50µm-Mikrosphären wurde ein Größenmessbereich von 30 [µm] bis 70 [µm] eingestellt. Für jede verwendete Größe von Mikrosphären wurden fünf Messwiederholungen durchgeführt. Vor jeder Messreihe wurde ein Teil der jeweiligen Mikrosphärensuspension in die Probeneinheit gefüllt und die Optik auf die darin enthaltenen Mikrosphären fokussiert. Vor jeder Einzelmessung wurde die Probeneinheit mit destilliertem Wasser gespült. Das von der Kamera erzeugte Hintergrundbild wird vor dem Beginn jeder Einzelmessung von der FlowCam automatisch kalibriert. Alle Messungen wurden im *scatter*-Modus durchgeführt.

Die von der FlowCam gemessenen Größen der standardisierten Mikrosphären werden als mittlerer ESD (*equivalent spherical diameter*) [µm] und ABD (*area based diameter*) [µm] ausgegeben. Für die Bestimmung der mittleren Größe der standardisierten Mikrosphären wurde der ESD [µm] verwendet.

Für jede der angewendeten Methoden wurde die Abweichung der gemessenen Größe der standardisierten Mikrosphären von ihrer nominellen Größe errechnet.

2.1.2 Vermessung von Coccolithophoriden-Zellen

Zur Vermessung von Coccolithophoriden-Zellen wurden Zellen der Spezies *Emiliania huxleyi* aus einer Reinkultur verwendet. Die mittlere Größe der Zellen in je drei Proben wurde mit dem Coulter Counters (Z2 Coulter Particle Counter and Analyzer, Beckman Coulter, USA), dem Durchlichtmikroskop (Zeiss Axiovert 100, Carl Zeiss AG, Deutschland) sowie der FlowCam (Portable FlowCam, Fluid-Imaging Tech., USA) bestimmt. Die Ergebnisse aller Messungen wurden miteinander verglichen.

Coulter Counter:

Für die Vermessung der Coccolithophoriden-Zellen mit dem Coulter Counter wurden je 10 [ml] Probe aus der verwendeten Reinkultur in drei Messbehälter (Beckman Coulter, USA) überführt und die mittlere Größe der enthaltenen Zellen mit dem Coulter Counter ermittelt. Für jede der drei Messungen wurde ein Stichprobenvolumen von 0,5 [ml] eingestellt. Vor jeder Messung wurde der Coulter Counter mit destilliertem Wasser gespült. Für die Berechnung der mittleren Größe durch den Coulter Counter wurde ein in die Berechnung einfließender Größensbereich von 2,3 bis 7,5 [μm] eingestellt. Die durch den Coulter Counter ermittelten Größen wurden als mittlerer Durchmesser [μm] mit der dazugehörigen Standardabweichung [μm] ausgegeben. Die Ergebnisse der Messungen wurden mit Hilfe der für den Coulter Counter bestimmten Abweichung von der nominellen Größe 10 [μm] großer Mikrosphären korrigiert.

Durchlichtmikroskopie:

Zur Vermessung der Coccolithophoriden-Zellen mit dem Durchlichtmikroskop wurden drei Objektkammern mit je 3 [ml] einer Probe aus der Reinkultur gefüllt und mit einem Deckglas luftdicht verschlossen. Es wurde ein Objektiv mit 100-facher optischer Vergrößerung und ein Messokular mit 10-facher optischer Vergrößerung gewählt. Damit ergab sich eine 1000-fache Gesamtvergrößerung. Bei

1000-facher Gesamtvergrößerung entspricht ein Teilstrich der verwendeten Messskala 1,14 [µm]. Bei jeder der drei Objektkammern wurden 30 einzelne Zellen fokussiert und ihr Durchmesser anhand der Anzahl von Teilstrichen im Messokular ermittelt. Die auf der Skala des Messokulars abgelesene Anzahl von Teilstrichen wurde dann mit dem zuvor bestimmten Abstand pro Teilstrich [µm] bei entsprechender Vergrößerung multipliziert.

$$D = N * k$$

(D = Durchmesser; N = Anzahl der Teilstriche; k = konstanter Abstand der Teilstriche)

Bei einer der drei Objektkammern wurden zusätzlich 90 einzelne Zellen bei gleicher Vorgehensweise vermessen. Alle Ergebnisse der Messungen wurden mit Hilfe der für das Durchlichtmikroskop bestimmten Abweichung von der nominellen Größe 10 [µm] großer Mikrosphären korrigiert.

FlowCam:

Für die Vermessung der Coccolithophoriden-Zellen wurden eine Küvette mit einer Tiefe von $d = 50$ [µm] und das Objektiv mit 20-facher optischer Vergrößerung verwendet. Der entsprechende Kollimator wurde vor der Leuchtdiode installiert. Die optimalen Einstellungen des durch die Kamera erzeugten Hintergrundbildes wurden für die gewählte optische Vergrößerung den Herstellerangaben entsprechend vorgenommen (siehe Anhang, S. 65).

Der in die Berechnung der mittleren Zellgröße durch die FlowCam einfließende Größenmessbereich wurde auf 2 bis 10 [µm] festgelegt. Vor der Messung der drei Proben wurde ein Teil einer Probe in die Probeneinheit gefüllt und die Optik auf die darin enthaltenen Zellen fokussiert. Des Weiteren wurde vor jeder Messung einer Probe die Probeneinheit mit destilliertem Wasser gespült. Das von der Kamera erzeugte Hintergrundbild wird vor dem Beginn jeder Einzelmessung von der FlowCam automatisch kalibriert. Alle Messungen wurden im *scatter*-Modus durchgeführt.

Die von der FlowCam gemessenen Größen der Coccolithophoriden-Zellen werden als mittlerer ESD (*equivalent spherical diameter*) [μm] und ABD (*area based diameter*) [μm] ausgegeben. Für die mittleren Größen der Zellen wurde der ESD verwendet. Alle Ergebnisse der Messungen wurden mit Hilfe der für die FlowCam bestimmten Abweichung von der nominellen Größe 10 [μm] großer Mikrosphären korrigiert.

2.1.3 Volumina von Phytoplankton-Partikeln

Für die Bestimmungen der mittleren Partikelvolumina dreier Diatomeen-Gattungen (*Rhizosolenia sp.*, *Chaetoceros sp.* und *Thalassionema sp.*) wurden an sechs Tagen eines Mesokosmenexperiments Proben aus zwei verschiedenen Mesokosmen entnommen. Jede der Proben wurde mit der FlowCam (Portable FlowCam, Fluid-Imaging Tech., USA) analysiert und alle in den jeweiligen Proben enthaltenen Partikel aufgezeichnet.

Für die Analyse der Proben wurden eine Küvette mit einer Tiefe von $d = 1000$ [μm] und das Objektiv mit 2-facher optischer Vergrößerung verwendet. Die optimalen Einstellungen des durch die Kamera erzeugten Hintergrundbildes wurden für die gewählte optische Vergrößerung den Herstellerangaben entsprechend vorgenommen (siehe Anhang, S. 65). Vor der Messung der Proben wurde ein Teil einer Probe in die Probeneinheit gefüllt und die Optik auf die darin enthaltenen Partikel fokussiert. Des Weiteren wurde vor jeder Messung einer Probe die Probeneinheit mit destilliertem Wasser gespült. Das von der Kamera erzeugte Hintergrundbild wird vor dem Beginn jeder Einzelmessung von der FlowCam automatisch kalibriert. Alle Messungen wurden im *scatter*-Modus durchgeführt.

Anhand der von der FlowCam aufgezeichneten Bilder und mit Hilfe von Bestimmungsliteratur (Drebes, Hoppenrath und Elbrächter, 2009) wurden die für jede Probe aufgezeichneten Partikel der drei Diatomeen-Gattungen selektiert. Die in jeder Probe aufgezeichneten Partikel der drei Diatomeen-Gattungen wurden separat in je einem Datenverzeichnis gespeichert. Das mittlere Volumen der in einem Datenverzeichnis gespeicherten Partikel wird von der FlowCam anhand der ge-

messenen äquivalenten Kugeldurchmesser (ESD) sowie anhand der flächenbasierten Größenbestimmungen (ABD) automatisch berechnet. Für die Bestimmung des mittleren Partikelvolumens der drei Diatomeen-Gattungen wurde das ABD-Volumen verwendet.

Die mit Hilfe der FlowCam ermittelten Partikelvolumina wurden mit mittleren Zellvolumina, die anhand von Vermessungen mit einem Durchlichtmikroskop bestimmt wurden, verglichen. Mit der FlowCam wurden Volumina verschiedener Diatomeen-Gattungen bestimmt. Die mit dem Durchlichtmikroskop bestimmten Volumina galten für verschiedene Arten der drei Diatomeen-Gattungen. Für den Vergleich der Daten wurden die mit dem Durchlichtmikroskop bestimmten mittleren Zellvolumina der verschiedenen Arten einer Gattung anhand der Abundanzverhältnisse in den einzelnen Proben unterschiedlich stark gewichtet und zu mittleren Zellvolumina einer Gattung zusammengefasst.

2.2 Automatische Identifizierung von Phytoplankton-Partikeln

Zur Bestimmung der Qualität der automatischen Partikelidentifizierung mit der FlowCam (Portable FlowCam, FluidImaging Tech., USA) wurden an 12 Tagen eines Mesokosmenexperiments Proben aus sechs verschiedenen Mesokosmen entnommen. Jede der Proben wurde mit der FlowCam analysiert und alle in den jeweiligen Proben enthaltenen Partikel aufgezeichnet.

Für die Analyse der Proben wurden eine Küvette mit einer Tiefe von $d = 1000 \text{ } [\mu\text{m}]$ und das Objektiv mit 2-facher optischer Vergrößerung verwendet. Die optimalen Einstellungen des durch die Kamera erzeugten Hintergrundbildes wurden für die gewählte optische Vergrößerung den Herstellerangaben entsprechend vorgenommen (siehe Anhang S. 65). Vor der Messung der Proben wurde ein Teil einer Probe in die Probeneinheit gefüllt und die Optik auf die darin enthaltenen Partikel fokussiert. Des Weiteren wurde vor jeder Messung einer Probe die Probeneinheit mit destilliertem Wasser gespült. Das von der Kamera erzeugte Hintergrundbild wird vor dem Beginn jeder Einzelmessung von der FlowCam automatisch kalibriert. Alle Messungen wurden im *scatter*-Modus durchgeführt.

Anhand der von der FlowCam aufgezeichneten Bilder und mit Hilfe von Bestimmungsliteratur (Drebes et al., 2009) wurden die für jede Probe aufgezeichneten Partikel von drei Diatomeen-Gattungen (*Rhizosolenia sp.*, *Chaetoceros sp.* und *Thalassionema sp.*) selektiert.

Anhand eines Teils der aufgezeichneten Partikel der drei Diatomeen-Gattungen wurde für jede Gattung mit der Software der FlowCam eine Bibliothek mit einer Anzahl von über 400 Partikeln der jeweiligen Gattung angelegt. Die von der FlowCam aufgezeichneten Rohdatensätze jeder Probe wurden mit Hilfe jeder der angelegten Bibliotheken gefiltert.

Für jede der drei Diatomeen-Gattungen wurden anhand der aufgezeichneten Bilder die Anteile von durch die Bibliothek korrekt identifizierten Partikeln und irrtümlich identifizierten Partikeln manuell bestimmt. Des Weiteren wurde anhand der aufgezeichneten Bilder der Anteil der durch die Bibliothek korrekt identifizierten Partikel an den im Rohdatensatz jeder Probe tatsächlich vorhandenen Partikeln für jede der drei Diatomeen-Gattungen manuell ermittelt.

2.3 Bestimmungen von Partikelkonzentrationen

2.3.1 Sedimentationsfehler

Mit der FlowCam (Portable FlowCam, FluidImaging Tech., USA) wurde die Konzentration in einer Probe einer Mikrosphärensuspension und einer Probe einer Reinkultur von Coccolithophoriden (*Emiliana huxleyi*) bestimmt.

Für die Messung wurden eine Küvette mit einer Tiefe von $d = 50 \text{ } [\mu\text{m}]$ und das Objektiv mit 20-facher optischer Vergrößerung verwendet. Die optimalen Einstellungen des durch die Kamera erzeugten Hintergrundbildes wurden für die gewählte optische Vergrößerung den Herstellerangaben entsprechend vorgenommen (siehe Anhang S. 65). Vor der Messung wurde ein Teil der jeweiligen Probe in die Probeneinheit gefüllt und die Optik auf die darin enthaltenen Partikel fokussiert. Vor der Messung einer Probe wurde die Probeneinheit mit destilliertem Wasser gespült. Das von der Kamera erzeugte Hintergrundbild wird vor dem Beginn jeder Einzel-

messung von der FlowCam automatisch kalibriert. Alle Messungen wurden im *scatter*-Modus durchgeführt.

Zur Bestimmung der Partikelkonzentration wurden jeweils fünf Messwiederholungen nacheinander an derselben Probe durchgeführt. Die Messzeit für jede der Messwiederholungen betrug 17,5 [min] für die Mikrosphärensuspension und 10 [min] für die Reinkultur (*Emiliania huxleyi*). Die gemessene Partikelkonzentration [n/ml] wurde für jede der wiederholten Messungen anhand der Anzahl der von der FlowCam registrierten Partikel und dem aufgezeichneten Stichprobenvolumen [ml] errechnet.

2.3.2 Aufkonzentrieren von Proben

Zur Bestimmung des Effekts von inverser Filtration auf die mit der FlowCam (Portable FlowCam, FluidImaging Tech., USA) zu ermittelnde Partikelkonzentration wurde je eine Probe aus drei verschiedenen Tanks eines Mesokosmenexperiments entnommen. Ein Teil jeder der drei Proben wurde über inverse Filtration mit Hilfe eines Planktonsiebes (Maschenweite = 100 [μm]) fünffach aufkonzentriert. Der Rest jeder Probe wurde nicht weiter behandelt.

Für die Bestimmung der Partikelkonzentration wurden eine Küvette mit einer Tiefe von $d = 1000$ [μm] und das Objektiv mit 20-facher optischer Vergrößerung verwendet. Die optimalen Einstellungen des durch die Kamera erzeugten Hintergrundbildes wurden für die gewählte optische Vergrößerung den Herstellerangaben entsprechend vorgenommen (siehe Anhang S. 65). Vor der Messung wurde ein Teil einer der Proben in die Probeneinheit gefüllt und die Optik auf die darin enthaltenen Partikel fokussiert. Vor der Messung jeder Probe wurde die Probeneinheit mit destilliertem Wasser gespült. Das von der Kamera erzeugte Hintergrundbild wird vor dem Beginn jeder Einzelmessung von der FlowCam automatisch kalibriert. Alle Messungen wurden im *scatter*-Modus durchgeführt.

Die Partikelkonzentration [n/l] wurde für jede der drei untersuchten Proben (aufkonzentriert und unbehandelt) anhand der Anzahl der von der FlowCam auf-

gezeichneten Partikel und des aufgezeichneten Stichprobenvolumens [ml] errechnet. Die Ergebnisse für die unbehandelten Proben wurden mit den Ergebnissen für die fünffach aufkonzentrierten Proben verglichen.

2.3.3 Vergleich zwischen FlowCam und Durchlichtmikroskop

Die Partikelkonzentration einer Mikrosphärensuspension wurde mit dem Durchlichtmikroskop und der FlowCam im *scatter*-Modus sowie im *auto*-Modus bestimmt.

Durchlichtmikroskop:

Zur Bestimmung der Partikelkonzentration der Mikrosphärensuspension mit dem Durchlichtmikroskop wurden drei Objektkammern mit 3 [ml] der Mikrosphärensuspension gefüllt und mit einem Deckglas luftdicht verschlossen. Es wurde ein Objektiv mit 40-facher optischer Vergrößerung und ein Messokular mit 10-facher optischer Vergrößerung gewählt. Somit ergab sich eine 400-fache Gesamtvergrößerung. Die Anzahl der Mikrosphären in 50 verschiedenen Sichtfeldern des Messokulars wurde für jede Probe manuell bestimmt. Das Volumen des durch ein Sichtfeld abgedeckten Bereichs der Objektkammer beträgt 0,475 [mm³]. Damit ergibt sich ein Gesamtstichprobenvolumen von 23,75 [mm³] = 23,75 [μl]. Die Konzentration [n/ml] wurde anhand der Anzahl der Mikrosphären und des Stichprobenvolumens [μl] errechnet.

FlowCam:

Für die Bestimmung der Partikelkonzentration einer Mikrosphärensuspension wurden eine Küvette mit einer Tiefe von $d = 50$ [μm] und das Objektiv mit 20-facher optischer Vergrößerung verwendet. Der entsprechende Kollimator wurde vor der Leuchtdiode installiert. Die optimalen Einstellungen des durch die Kamera erzeugten Hintergrundbildes wurden für die gewählte optische Vergrößerung den Herstellerangaben entsprechend vorgenommen (siehe Anhang, S. 65).

Es wurden drei Messwiederholungen mit je einer Probe der Mikrosphärensuspension durchgeführt. Vor der Messung der drei Proben wurde ein Teil einer

Probe in die Probeneinheit gefüllt und die Optik auf die darin enthaltenen Mikrosphären fokussiert. Vor einer Messreihe wurde die Probeneinheit mit destilliertem Wasser gespült. Das von der Kamera erzeugte Hintergrundbild wird vor dem Beginn jeder Einzelmessung von der FlowCam automatisch kalibriert. Alle Messungen wurden im *scatter*-Modus durchgeführt.

Die Partikelkonzentration [n/ml] wurde für jede der drei untersuchten Proben anhand der Anzahl der von der FlowCam aufgezeichneten Mikrosphären und des aufgezeichneten Stichprobenvolumens[ml] errechnet.

Die Partikelkonzentration drei weiterer Proben der Mikrosphärensuspension wurde bei gleicher Vorgehensweise im *auto*-Modus bestimmt.

Aus den Ergebnissen für je drei Messwiederholungen mit dem Durchlichtmikroskop und der FlowCam im *scatter*-Modus sowie im *auto*-Modus wurde jeweils das arithmetische Mittel errechnet und die Mittelwerte für die drei Methoden miteinander verglichen.

Anmerkung:

Bei Messungen mit der FlowCam werden möglicherweise auftretende Gasbläschen in der Küvette als Partikel interpretiert. Gasbläschen, die in der Küvette hängen bleiben, können aus der Küvette entfernt werden, indem der Schlauch zwischen der Pumpe und der Küvette für einige Sekunden zusammengedrückt wird. Während der Schlauch zusammengedrückt wird, ist jedoch der Fluss der Probe durch die Küvette unterbrochen. Dies führt dazu, dass ein kleiner Teil der Probe von der Kamera mehrfach aufgezeichnet wird. Wird der Schlauch wieder freigegeben, erhöht sich durch den im Schlauch entstandenen Unterdruck kurzzeitig die Flussgeschwindigkeit der Probe. Dadurch können Partikel „verpasst“ werden und / oder Partikel werden aufgrund der entstehenden Bewegungsunschärfe falsch interpretiert. Das Zusammendrücken des Schlauches führt also zu Fehlern in der Messung.

2.4 Sinkgeschwindigkeit von Coccolithophoriden (*Emiliana huxleyi*)

Zur Bestimmung der Sinkgeschwindigkeit von Coccolithophoriden-Zellen wurden Proben aus 14 verschiedenen Kulturflaschen, in denen *Emiliana huxleyi* bei jeweils unterschiedlichen CO₂-Konzentrationen gewachsen sind, verwendet.

Für die Messung jeder einzelnen Probe wurde eine Küvette mit einer Tiefe von $d = 300 \text{ } [\mu\text{m}]$ mit der Probe gefüllt. Die an der Küvette angebrachten Schläuche wurden gekürzt und nicht an das Pumpsystem der FlowCam angeschlossen. Die Schläuche zu beiden Seiten der Küvette wurden mit Hilfe eines Glasstopfens verschlossen. Die mit der Probe gefüllte Küvette wurde in der optischen Einheit der FlowCam installiert. Es wurde ein Objektiv mit 20-facher optischer Vergrößerung gewählt und der entsprechende Kollimator wurde installiert. Die optimalen Einstellungen des durch die Kamera erzeugten Hintergrundbildes wurden für die gewählte optische Vergrößerung den Herstellerangaben entsprechend vorgenommen (siehe Anhang, S. 65). Für die Aufzeichnung der in der Küvette absinkenden Zellen wurde der *auto*-Modus gewählt. Die Bilderzeugungsrate der Kamera wurde auf 1 [Bild/sec] festgelegt. Jedes einzelne Aufzeichnungsereignis wurde von der FlowCam automatisch gespeichert.

Bei der Auswertung der Datensätze wurden die von der FlowCam gespeicherten Daten jeder einzelnen Probe zunächst in eine separate Datei eines Tabellenkalkulationsprogramms exportiert. Jeder einzelne Datensatz wurde anhand der *CaptureX*-Werte [Pixel] in mehrere Unterverzeichnisse aufgeteilt. Jedes Unterverzeichnis entspricht dann einer senkrechten Achse im von der Kamera erfassten Bereich mit einer Breite (Anzahl der Pixel für *CaptureX*), die dem mittleren Zelldurchmesser (Anzahl der Pixel * Kalibrierungskonstante) gleichgesetzt wurde.

Innerhalb eines Unterverzeichnisses (senkrechte Achse im Bild der Kamera) wurden alle Aufzeichnungsereignisse nach dem Zeitpunkt der Speicherung ($\pm 0,001 \text{ } [\text{sec}]$) sortiert. Anhand der *CaptureY*-Werte [Pixel] konnten dann einzelne Zellen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten an mehreren Orten auf der senkrechten Achse im Bild der Kamera aufgezeichnet wurden, unterschieden werden.

Die von einer Zelle während des Absinkens zurückgelegte Strecke wurde anhand der Differenz der *CaptureY*-Werte (Orte auf der senkrechten Achse) zu unterschiedlichen Aufzeichnungszeitpunkten mit Hilfe der Kalibrierungskonstanten für die gewählte Vergrößerung ermittelt.

Beispiel:

$$D = (10 [\text{CaptureY}] - 510 [\text{CaptureY}]) * 0,36 [\mu\text{m}] = \underline{180 [\mu\text{m}]}$$

Die für die zurückgelegte Strecke benötigte Zeit wurde aus der Differenz der entsprechenden Aufzeichnungszeitpunkte ermittelt.

Beispiel:

$$T = 12 [\text{h}] 30 [\text{min}] 1,000 [\text{sec}] - 12 [\text{h}] 30 [\text{min}] 11,000 [\text{sec}] = \underline{10 [\text{sec}]}$$

Anhand der für jede einzelne Zelle ermittelten Strecke und Zeit wurde die Sinkgeschwindigkeit jeder Zelle bestimmt.

Beispiel:

$$V = D / T = 180 [\mu\text{m}] / 10 [\text{sec}] = \underline{18 [\mu\text{m}/\text{sec}]}$$

Für jeden der Datensätze (Probe einer Reinkultur) wurde die mittlere Sinkgeschwindigkeit [m/Tag] und die Standardabweichung berechnet. Die so ermittelten mittleren Sinkgeschwindigkeiten [m/Tag] von *Emiliana huxleyi* wurden mit den jeweiligen CO₂-Konzentrationen und PIC/POC-Verhältnissen der Reinkulturen korreliert.

3. Ergebnisse

3.1 Größenmessungen

Der Partikeldurchmesser von standardisierten Mikrosphären und Coccolithophoriden-Zellen (*Emiliana huxleyi*) wurden mit dem Coulter Counter, der FlowCam und dem Durchlichtmikroskop bestimmt. Die Ergebnisse der drei verschiedenen Methoden wurden miteinander verglichen.

3.1.1 Standardisierte Mikrosphären

Der mit dem Coulter Counter gemessene mittlere Durchmesser aus einem Stichprobenumfang von $n = 1666$ für 10 μm große standardisierte Mikrosphären beträgt $9,30 \pm 0,26 \text{ } \mu\text{m}$. Dies entspricht einer Abweichung von der angegebenen Größe des Standards von -7,0 [%]. Der mittlere Durchmesser für 20 μm -Mikrosphären beträgt $18,20 \pm 0,31 \text{ } \mu\text{m}$. Der Stichprobenumfang beträgt $n = 847$. Hier weicht die gemessene Größe der Standardpartikel von der angegebenen Größe um -9,0 [%] ab. Bei 50 μm -Mikrosphären beträgt der mit dem Coulter Counter gemessene Durchmesser $45,91 \pm 0,47 \text{ } \mu\text{m}$ bei einem Stichprobenumfang von $n = 1026$. Damit erscheinen sie um 8,18 [%] kleiner als vom Hersteller angegeben (Abb. 1, Tab. 1). Die Schwankung um den Mittelwert der gemessenen Durchmesser beträgt $\pm 2,79$ [%] für 10 μm , $\pm 1,70$ [%] für 20 μm und $\pm 1,02$ [%] für 50 μm -Mikrosphären.

Für die 10 μm -Mikrosphären wurde mit der FlowCam ein mittlerer Durchmesser von $10,30 \pm 0,24 \text{ } \mu\text{m}$ gemessen. Somit erscheinen sie bei dieser Methode 3,0 [%] größer als vom Hersteller angegeben. Der Stichprobenumfang beträgt $n = 76$. Bei 20 μm -Mikrosphären beträgt der mittlere Durchmesser bei einem Stichprobenumfang von $n = 91$ $19,90 \pm 0,57 \text{ } \mu\text{m}$. Damit ist die Abweichung vom angegebenen Durchmesser mit -0,5 [%] bei 20 μm -Mikrosphären kleiner als bei 10 μm -Mikrosphären. Der mit der FlowCam ermittelte Durchmesser für 50 μm -Mikrosphären beträgt $48,14 \pm 0,94 \text{ } \mu\text{m}$. Dies entspricht einer Abweichung vom angegebenen Durchmesser des Standards von -3,27 [%] (Abb. 1, Tab. 1). Der Stichprobenumfang beträgt hier $n = 432$. Die Schwankung um den Mittelwert der gemessenen Durch-

messer beträgt $\pm 2,33$ [%] für 10 μm und $\pm 2,86$ [%] für 20 μm -Mikrosphären. Für 50 μm -Mikrosphären beträgt die Schwankung um den Mittelwert des Durchmessers $\pm 1,95$ [%].

Bei der Vermessung mit dem Durchlichtmikroskop beträgt der mittlere Durchmesser für 10 μm -Mikrosphären 10,26 μm . Die gemessene Größe der standardisierten Mikrosphären ist also 2,60 [%] größer als vom Hersteller angegeben. Für 20 μm -Mikrosphären beträgt der mittlere Durchmesser 22,05 μm . Die Partikel erscheinen also 10,25 [%] größer als vom Hersteller angegeben. Bei 50 μm großen standardisierten Mikrosphären wurde ein mittlerer Durchmesser von 49,50 μm mit dem Durchlichtmikroskop gemessen. Hier beträgt die Abweichung von der angegebenen Größe des Standards -1,0 [%] (Abb. 1, Tab. 1). Der Stichprobenumfang beträgt für jede Messung mit dem Durchlichtmikroskop $n = 20$. Bei der Vermessung der standardisierten Mikrosphären mit dem Durchlichtmikroskop wurde für je 20 Mikrosphären jeder Größe (10 μm , 20 μm , 50 μm) immer derselbe Messwert erzielt. Auch bei einem Stichprobenumfang von $n = 100$ vermessenen Mikrosphären konnte keine Variation in der Größe festgestellt werden.

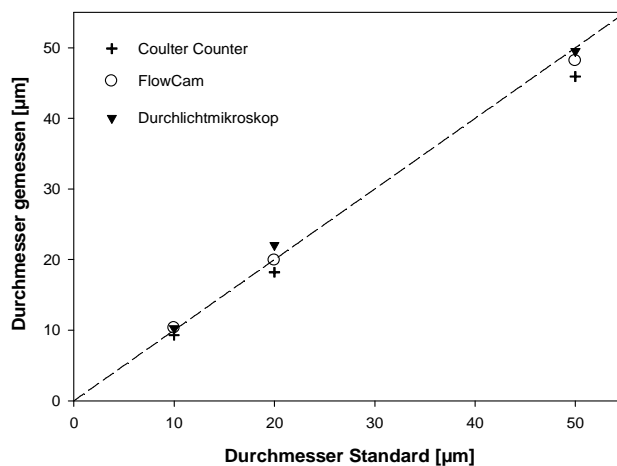


Abb. 1: Mit dem Coulter Counter, dem Durchlichtmikroskop und der FlowCam gemessene mittlere Durchmesser von standardisierten Mikrosphären der Größen 10 μm , 20 μm und 50 μm gegen den vom Hersteller angegebenen Durchmesser der Mikrosphären aufgetragen. Für die mit Hilfe des Coulter Counters und der FlowCam ermittelten Werte ist der Median aus fünf Messwiederholungen dargestellt, für die Vermessung mit dem Durchlichtmikroskop der ermittelte Wert aus einer Messung.

Der gemessene mittlere Durchmesser der standardisierten Mikrosphären ist bei der Bestimmung mit dem Coulter Counter immer kleiner als die Angabe des Herstellers. Die Abweichung beträgt zwischen -7,0 [%] und -9,0 [%] (Tab. 1).

Der mit der FlowCam bei 20-facher optischer Vergrößerung bestimmte mittlere Durchmesser von 20µm-Mikrosphären ist der vom Hersteller angegebenen Größe am nächsten. Die größte Abweichung für diese Methode (-3,27 [%]) wurde für 50µm-Mikrosphären bei 4-facher optischer Vergrößerung gemessen (Tab. 1).

Bei der Vermessung mit dem Durchlichtmikroskop bei 400-facher optischer Vergrößerung ist die Abweichung vom angegebenen Durchmesser für 20 [µm] große Mikrosphären mit +10,25 [%] am größten und für 50µm-Mikrosphären (-1,0 [%]) am kleinsten (Tab. 1).

Methode	Abweichung [%]	Abweichung [%]	Abweichung [%]
	10µm-Standard	20µm-Standard	50µm-Standard
Coulter Counter	-7,0	-9,0	-8,18
FlowCam	+3,0 (20x)	-0,5 (20x)	-3,27 (4x)
Durchlichtmikroskop	+2,6 (1000x)	+10,25 (400x)	-1,0 (400x)

Tab. 1: Abweichungen von der vom Hersteller angegebenen Größe der standardisierten Mikrosphären für die angewendeten Methoden und verwendeten Größen der Mikrosphären. Die gewählte optische Vergrößerung ist in Klammern angegeben.

3.1.2 Coccolithophoriden (*Emiliania huxleyi*)

Für die Vermessung von Coccolithophoriden-Zellen (*Emiliania huxleyi*) mit dem Coulter Counter beträgt die kleinste gemessene mittlere Zellgröße $6,31 \pm 0,68$ [µm] und die größte $6,47 \pm 0,66$ [µm]. Der Median beträgt $6,32 \pm 0,68$ [µm]. Die Schwankung um den mittleren Zelldurchmesser beträgt zwischen 10,25 [%] und 10,76 [%] (Tab. 2, Abb. 2). Für alle drei Messungen ist der Stichprobenumfang $n > 4500$.

Bei der Bestimmung des mittleren Zelldurchmessers mit Hilfe der FlowCam beträgt der kleinste ermittelte Wert $7,01 \pm 0,75$ [μm] und der größte $7,35 \pm 0,82$ [μm]. Der Median beträgt hier $7,14 \pm 0,86$ [μm] und entspricht in etwa dem mit dem Coulter Counter ermittelten Wert. Für jede Messung mit der FlowCam ist der Stichprobenumfang $n = 30$. Die Schwankung beträgt zwischen 10,71 [%] und 12,09 [%] (Tab. 2, Abb. 2).

Die mit Hilfe des Durchlichtmikroskops bestimmten mittleren Zelldurchmesser von *Emiliana huxleyi* betragen zwischen min. $8,88 \pm 0,79$ [μm] und max. $8,96 \pm 0,89$ [μm]. Der Median beträgt bei dieser Methode $8,96 \pm 0,84$ [μm]. Der mit dem Durchlichtmikroskop ermittelte Wert ist also deutlich größer als die Werte der Messungen mit dem Coulter Counter und der FlowCam. Die Schwankung um den mittleren Zelldurchmesser ist mit 8,92 [%] bis 9,99 [%] bei der Durchlichtmikroskopie am kleinsten. Für jede Messung ist der Stichprobenumfang auch hier $n = 30$. Die Messung des mittleren Zelldurchmessers von *Emiliana huxleyi* bei einem Stichprobenumfang von $n = 90$ ergab $9,17 \pm 0,84$ [μm]. Die Schwankung um diesen Wert liegt also mit $\pm 9,36$ [%] im selben Bereich (Tab. 2, Abb. 2).

Method	Zellgröße [μm]	StAbw [μm]	StAbw [%]
Coulter Counter	6,32	0,68	10,70
	6,47	0,66	10,25
	6,31	0,68	10,76
FlowCam	7,35	0,82	11,13
	7,14	0,86	12,09
	7,01	0,75	10,71
Durchlichtmikroskop	8,96	0,89	9,99
	8,96	0,84	9,41
	8,88	0,79	8,92

Tab. 2: Mit dem Coulter Counter, der FlowCam und dem Durchlichtmikroskop bestimmte mittlere Zellgrößen [μm] von *Emiliana huxleyi*. Für jede der drei Methoden sind die Ergebnisse aus der Messung von drei Replikaten der gleichen Reinkultur sowie die Standardabweichung [μm] und [%] dargestellt.

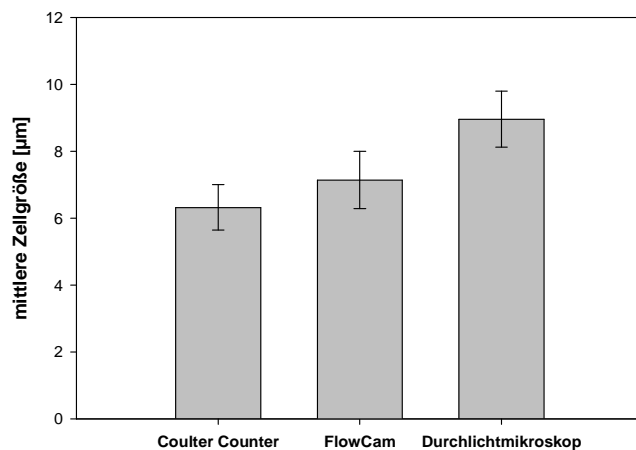


Abb. 2: Dargestellt ist der Median aus drei Messungen der mittleren Zellgröße von *Emiliana huxleyi* mittels der drei verschiedenen Methoden sowie die jeweilige Standardabweichung. Eine Veränderung der Zellgröße zwischen den Messzeitpunkten der drei Methoden kann ausgeschlossen werden.

Bei der Bestimmung der Größe von standardisierten Mikrosphären und Coccolithophoriden-Zellen (*Emiliana huxleyi*) ergaben die Messungen mit dem Coulter Counter die kleinsten Werte. Die größten Werte wurden mit dem Durchlichtmikroskop gemessen.

3.1.3 Volumina von Phytoplankton-Partikeln

Die mittleren Volumina verschiedener Diatomeen-Gattungen wurden mit der FlowCam bestimmt und die Ergebnisse mit Zellvolumina, die mit Hilfe von Vermessungen mit dem Durchlichtmikroskop ermittelt wurden, verglichen.

Das mit der FlowCam bestimmte mittlere Volumen von *Rhizosolenia sp.* beträgt 465500 [µm³] und der mit Hilfe des Durchlichtmikroskops ermittelte Wert beträgt 335498 [µm³] (Tab. 3). Der mit der FlowCam bestimmte Wert ist 38,75 [%] höher als der Wert für die Durchlichtmikroskopie.

Für *Chaetoceros sp.* wurde mit der FlowCam ein mittleres Volumen von 255000 [µm³] gemessen. Der mit dem Durchlichtmikroskop ermittelte Wert beträgt 529 [µm³] (Tab. 3). Damit ist das mit der FlowCam ermittelte Volumen 482-mal so groß wie der Wert für die Bestimmung mit dem Durchlichtmikroskop.

Bei der Bestimmung des Volumen für *Thalassionema sp.* beträgt der mit der FlowCam ermittelte Wert 201500 [μm^3]. Das mit dem Durchlichtmikroskop bestimmte Volumen für *Thalassionema sp.* beträgt 1800 [μm^3] (Tab. 3). Das mit der FlowCam bestimmte Volumen ist für *Thalassionema sp.* also 112-mal so groß wie das mit dem Durchlichtmikroskop bestimmte Volumen.

Partikel	Volumen [μm^3]	Volumen [μm^3]
	Durchlichtmikroskop	FlowCam
<i>Rhizosolenia sp.</i>	335498	465500
<i>Chaetoceros sp.</i>	529	255000
<i>Thalassionema sp.</i>	1800	201500

Tab. 3: Vergleich der mit dem Durchlichtmikroskop und der FlowCam bestimmten Volumina von Phytoplankton-Partikeln. Jeder Wert ist der Median aus sechs Messungen des Partikelvolumens [μm^3].

3.2 Automatische Identifizierung von Phytoplankton-Partikeln

Die enthaltenen Phytoplankton-Partikel je einer Wasserprobe an 12 Messtagen aus je sechs Mesokosmen wurden mit der FlowCam aufgezeichnet. Anhand eines Teils der erhaltenen Daten wurden Bibliotheken für drei verschiedene Gattungen von Diatomeen angelegt. Die mit der FlowCam erhobenen Daten für jede Probe wurden mit Hilfe der Bibliotheken automatisch untersucht und die Ergebnisse manuell überprüft.

Bei der automatischen Identifizierung von Partikeln mit Hilfe der Bibliothek für *Rhizosolenia sp.* beträgt der durch die Bibliothek erkannte Anteil an den in der jeweiligen Probe vorhandenen *Rhizosolenia*-Zellen im Mittel 57,99 [%] und 42,01 [%] wurden von der Bibliothek übersehen (Abb. 3). Der mittlere Anteil von *Rhizosolenia*-Zellen an den durch die Bibliothek als solche identifizierten Partikeln beträgt 97,38 [%]. Somit wurden 2,62 [%] irrtümlich als *Rhizosolenia* identifiziert (Abb. 4). Die Anzahl untersuchter Proben beträgt $n = 27$.

Für die automatische Identifizierung von *Chaetoceros sp.* mit Hilfe der Bibliothek beträgt der mittlere Anteil durch die Bibliothek erkannter Chaetoceros-Partikel an den tatsächlich vorhandenen Chaetoceros-Partikeln 25,41 [%] und 74,59 [%] der Chaetoceros-Partikel wurden nicht als solche identifiziert (Abb. 3). Der Anteil der durch die Bibliothek korrekt als *Chaetoceros* erkannten Partikel beträgt hier im Mittel 58,3 [%] und 41,7 [%] wurden fälschlich als solche identifiziert (Abb. 4). Die Anzahl untersuchter Proben beträgt $n = 25$.

Bei der mit Hilfe der Bibliothek für *Thalassionema sp.* durchgeführten automatischen Partikelidentifizierung wurden im Mittel 73,72 [%] der in der jeweiligen Probe enthaltenen Thalassionema-Partikel als solche identifiziert und 26,28 [%] wurden nicht automatisch als *Thalassionema* erkannt (Abb. 3). Der Anteil der durch die Bibliothek korrekt als *Thalassionema* erkannten Partikel beträgt hier im Mittel 23,33 [%] und 76,67 [%] wurden irrtümlich als solche identifiziert (Abb. 4). Die Anzahl untersuchter Proben ist hier $n = 20$.

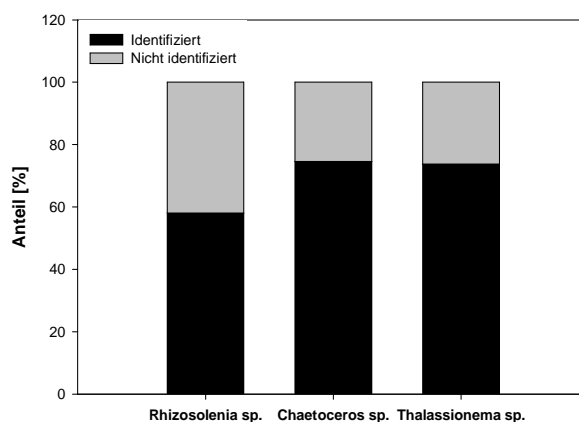


Abb. 3: Verhältnis der mit Hilfe der Bibliotheken identifizierten und nicht identifizierten Phytoplankton-Partikel. Jeder Balken stellt das mittlere Verhältnis aus min. 20 untersuchten Proben für die jeweilige Art von Phytoplankton-Partikeln dar.

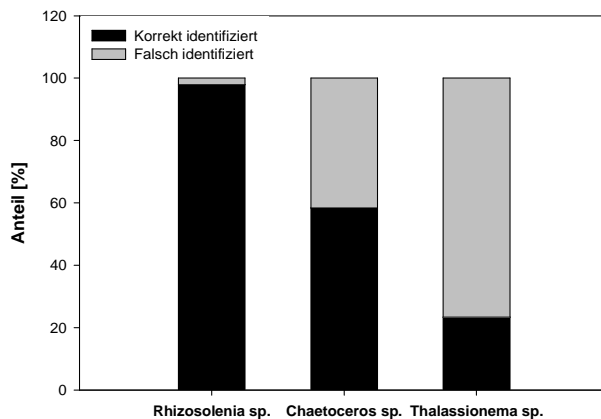


Abb. 4: Verhältnis korrekt und falsch identifizierter Phytoplankton-Partikel der mit Hilfe der Bibliotheken automatisch erstellten Antwortmenge. Jeder Balken stellt das mittlere Verhältnis aus min. 20 untersuchten Proben für die jeweilige Art von Phytoplankton-Partikeln dar.

Bei der automatischen Identifizierung von Diatomeen mit Hilfe der angelegten Bibliotheken für die jeweiligen Gattungen wurden *Rhizosolenia sp.* größtenteils korrekt als solche erkannt (97,38 [%]), jedoch wurden im Mittel fast die Hälfte (42,01 [%]) der in einer Probe vorkommenden *Rhizosolenia sp.* nicht als solche identifiziert. Bei *Chaetoceros sp.* und *Thalassionema sp.* konnten im Mittel über 20 [%] der in einer Probe vorkommenden Partikel dieser Gattungen nicht automatisch als solche identifiziert werden. Große Teile (41,7 [%] bzw. 76,67 [%]) der automatisch als *Chaetoceros* bzw. *Thalassionema* identifizierten Partikel wurden durch die Bibliothek irrtümlich als solche erkannt.

3.3 Bestimmungen von Partikelkonzentrationen

3.3.1 Sedimentationsfehler

Die Konzentration einer Mikrosphärensuspension und einer Reinkultur von Coccolithophoriden (*Emiliana huxleyi*) wurden mit der FlowCam bestimmt. Es wurden jeweils fünf Messwiederholungen an derselben Probe durchgeführt. Die Messzeit für jede der Messwiederholungen beträgt 17,5 [min] für die Mikrosphärensuspension und 10 [min] für die Reinkultur (*Emiliana huxleyi*) (Abb. 5, Abb. 6).

Die gemessene Mikrosphärenkonzentration bei der ersten Messung beträgt 9662 [n/ml] und 3243 [n/ml] bei der letzten Messwiederholung. Dies entspricht einer Differenz der gemessenen Konzentration von -6719 [n/ml] zwischen der ersten und der letzten Messung. Die gemessene Konzentration der Mikrosphären hat also über den gesamten Zeitraum der Messungen um 66,44 [%] abgenommen (Abb. 5).

Bei der ersten Parallelmessung der Konzentration der Zellen (*Emiliana huxleyi*) beträgt der ermittelte Wert 37568 [n/ml]. Bei der letzten Messwiederholung wurde eine Konzentration von 14865 [n/ml] ermittelt. Die Differenz zur ersten Messung beträgt also -22703 [n/ml]. Dies entspricht einer Abnahme der Konzentration über den gesamten Zeitraum der Messungen von 60,43 [%] (Abb. 6).

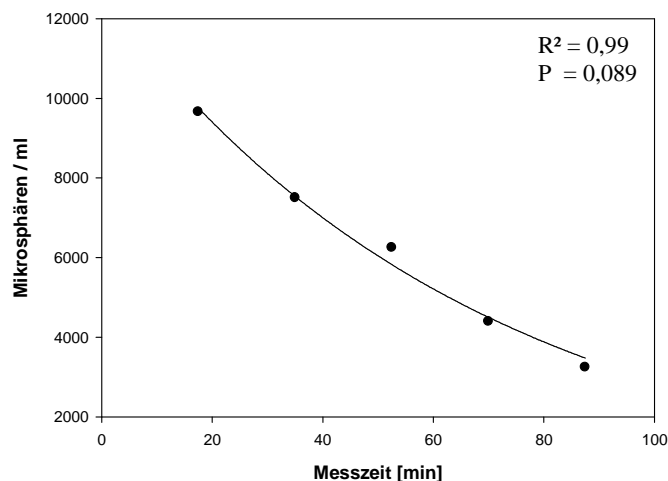


Abb. 5: Mit Hilfe der FlowCam bestimmte Konzentration von 10µm-Mikrosphären in einer Probe. Jeder Datenpunkt stellt eine Messwiederholung derselben Probe dar. R^2 für die nicht lineare Regression (schwarze Linie) und P für den Normalitätstest (Shapiro-Wilk) sind oben rechts angegeben.

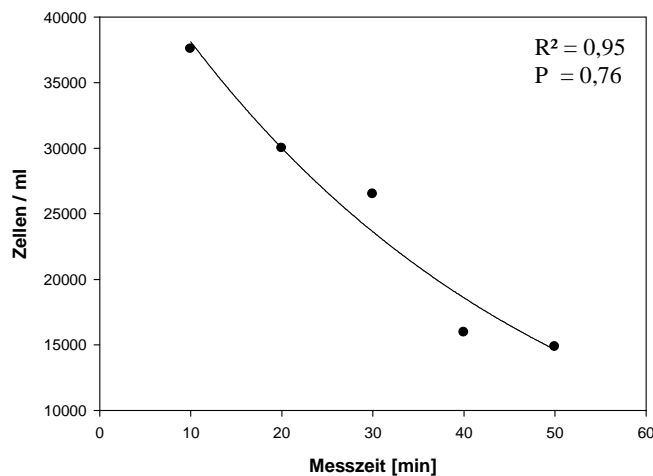


Abb.6: Mit Hilfe der FlowCam bestimmte Konzentration einer Reinkultur von *Emiliana huxleyi* in einer Probe. Jeder Datenpunkt stellt eine Messwiederholung derselben Probe dar. R^2 für die nicht lineare Regression (schwarze Linie) und P für den Normalitätstest (Shapiro-Wilk) sind oben rechts angegeben.

3.3.2 Aufkonzentrieren von Proben

Die Partikelkonzentration eines unbehandelten und eines durch inverse Filtration fünffach aufkonzentrierten Teils je einer Wasserprobe aus drei Mesokosmen wurde mit der FlowCam bestimmt. Die Ergebnisse für den unbehandelten und den aufkonzentrierten Teil jeder Probe wurden miteinander verglichen.

Die aus einem Stichprobenvolumen von 33,6 [ml] ermittelte Partikelkonzentration in der unbehandelten Probe von Mesokosmos 1 beträgt 2917 [n/l]. Die Messung der fünffach aufkonzentrierten Probe ergibt bei Rückrechnung auf das Ausgangsvolumen 1850 [n/l] (Stichprobenvolumen 19,3 [ml]). Die ermittelte Partikelkonzentration der fünffach aufkonzentrierten Probe ist damit 36,56 [%] kleiner als die der unbehandelten Probe (Abb. 7).

In der unbehandelten Probe aus Mesokosmos 2 wurde eine Partikelkonzentration von 4298 [n/l] gemessen. Das Stichprobenvolumen beträgt hier 25,13 [ml]. Die Partikelkonzentration der fünffach aufkonzentrierten Probe aus Mesokosmos 2 beträgt nach Rückrechnung auf das Ausgangsvolumen und einem Stichproben-

volumen von 19,5 [ml] 3231 [n/l] und ist damit 24,82 [%] kleiner als die in der un-
behandelten Probe (Abb. 7).

Die Bestimmung der Partikelkonzentration für die Proben aus Mesokosmos 3 ergab 4228 [n/l] in der unbehandelten Probe und 2014 [n/l] in der aufkonzentrierten Probe. Die Konzentration der Partikel in der aufkonzentrierten Probe erscheint hier 52,35 [%] niedriger als in der unbehandelten Probe (Abb. 7). Die Stichproben-
volumina betragen 34,8 [ml] für die unbehandelte und 19,5 [ml] für die auf-
konzentrierte Probe.

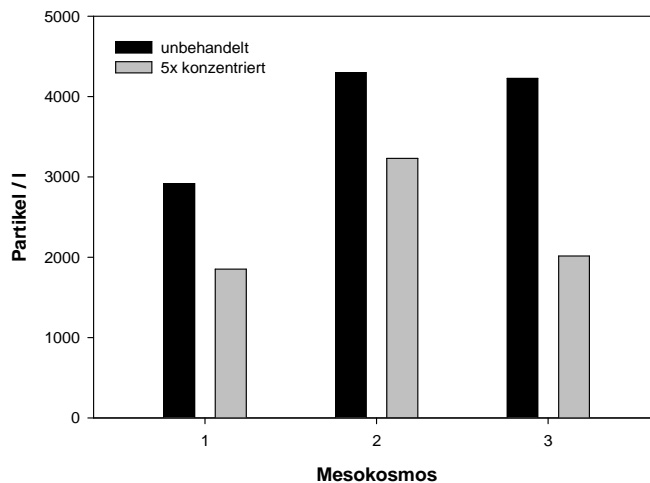


Abb. 7: Mit Hilfe der FlowCam bestimmte Partikelkonzentration in drei verschiedenen Mesokosmen. Für jeden Mesokosmos ist der Wert [Partikel/l] der Messung einer unbehandelten Probe (schwarz) und einer fünffach konzentrierten Probe (grau) dargestellt.

3.3.3 Vergleich zwischen FlowCam und Durchlichtmikroskop

Die Partikelkonzentration einer Mikrosphärensuspension wurde mit dem Durchlichtmikroskop und der FlowCam im *scatter*-Modus sowie im *auto*-Modus bestimmt. Die Ergebnisse aus den Messungen mit den drei verschiedenen Methoden wurden miteinander verglichen.

Die Zählung der Mikrosphären mit Hilfe des Durchlichtmikroskops ergab eine mittlere Konzentration von 9432 ± 891 [n/ml]. Bei der Zählung mit der FlowCam

im *scatter*-Modus beträgt die mittlere Konzentration 8784 ± 758 [n/ml] (Abb. 8). Zwischen den mit dem Durchlichtmikroskop und der FlowCam im *scatter*-Modus gemessenen mittleren Partikelkonzentrationen gibt es keinen signifikanten Unterschied (ANOVA, $P = 0,31$).

Bei der Bestimmung der mittleren Konzentration mit der FlowCam im *auto*-Modus wurde ein Wert von 6346 ± 386 [n/ml] gemessen (Abb. 8). Die mittlere Konzentration ist bei der Zählung mit der FlowCam im *auto*-Modus signifikant kleiner als die mit den anderen beiden Methoden ermittelten Werte (ANOVA, $P = 0,004$).

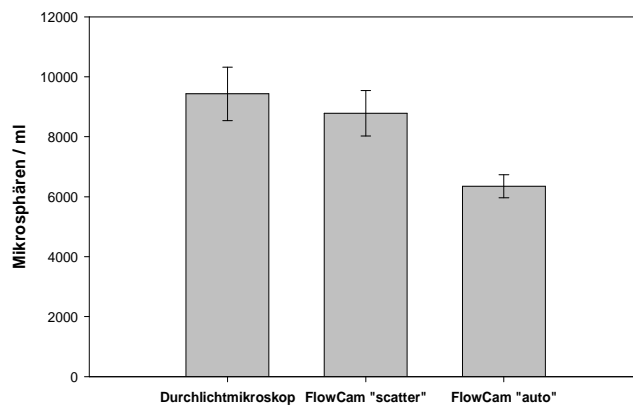


Abb. 8: Mit Hilfe des Durchlichtmikroskops und der FlowCam bestimmte Partikelkonzentrationen einer Mikrosphärensuspension. Für jede der angewendeten Methoden sind der Mittelwert [Mikrosphären/ml] aus drei Messwiederholungen und die Standardabweichung dargestellt.

Die mit der FlowCam im *auto*-Modus bestimmte Konzentration [n/ml] ist 32,72 [%] niedriger als die mit Hilfe des Durchlichtmikroskops bestimmte Konzentration und 27,76 [%] niedriger als die mit der FlowCam im *scatter*-Modus ermittelte Konzentration.

3.4 Sinkgeschwindigkeit von Coccolithophoriden (*Emiliana huxleyi*)

Die Sinkgeschwindigkeiten von Coccolithophoriden-Zellen (*Emiliana huxleyi*) aus Reinkulturen, die unter dem Einfluss unterschiedlicher CO₂-Konzentrationen gewachsen sind, wurden mit der FlowCam bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit der

jeweiligen CO₂-Konzentration und dem Verhältnis von partikulärem anorganischen Kohlenstoff (PIC) zu partikulärem organischen Kohlenstoff (POC) korreliert.

Die gemessene mittlere Sinkgeschwindigkeit der Coccolithophoriden-Zellen (*Emiliania huxleyi*) im alkalischeren Bereich bei CO₂-Partialdrücken zwischen 185 [ppm] und 267 [ppm] beträgt 0,38 [m/Tag] und nimmt mit steigenden CO₂-Partialdrücken ab. Minimale Sinkgeschwindigkeiten von 0,22 [m/Tag] wurden im saureren Bereich bei den höchsten CO₂-Partialdrücken zwischen 1264 [ppm] und 1286 [ppm] gemessen (Abb. 9). Somit ergibt sich über den gesamten CO₂-Gradienten eine Abnahme der gemessenen Sinkgeschwindigkeit der Coccolithophoriden-Zellen von 0,16 [m/Tag]. Der Stichprobenumfang beträgt für jedes der vier Intervalle von CO₂-Konzentrationen min. n = 59 Zellen. Die Abnahme der gemessenen mittleren Sinkgeschwindigkeit mit zunehmender CO₂-Konzentration ist über den gesamten CO₂-Gradienten signifikant (ANOVA, $P < 0,05$). Die einzige Ausnahme stellt der Bereich zwischen 482 [ppm] und 895 [ppm] dar. Zwischen diesen CO₂-Partialdrücken konnte keine signifikante Veränderung der Sinkgeschwindigkeit festgestellt werden (ANOVA, $P > 0,05$).

Für ein PIC/POC-Verhältnis von 0,24 wurde eine mittlere Sinkgeschwindigkeit der Coccolithophoriden-Zellen (*Emiliania huxleyi*) von 0,18 [m/Tag] gemessen. Die gemessene mittlere Sinkgeschwindigkeit bei einem PIC/POC-Verhältnis von 1,12 beträgt 0,38 [m/Tag] (Abb. 10). Bei einer Zunahme des PIC/POC-Verhältnisses von 1,0 steigt die Sinkgeschwindigkeit der Coccolithophoriden-Zellen um 0,19 [m/Tag] (lineare Regression, $R^2 = 0,68$).

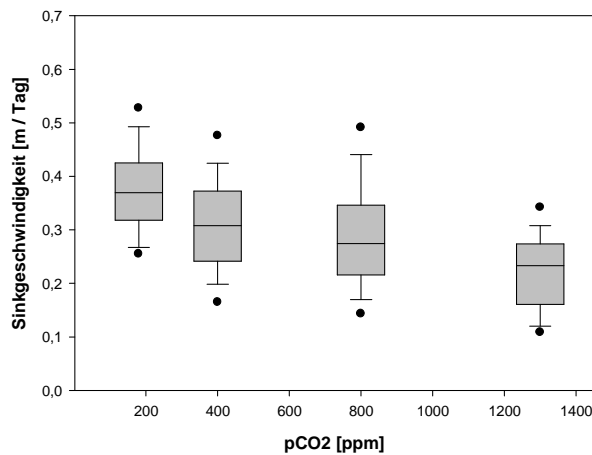


Abb. 9: Sinkgeschwindigkeit von Coccolithophoriden-Zellen (*Emiliana huxleyi*) in Abhängigkeit vom pCO₂ [ppm]. Jede Box stellt die Sinkgeschwindigkeiten von min. 59 Zellen zwischen dem 5. und dem 95. Perzentil dar. Ausreißer sind als schwarze Punkte dargestellt.

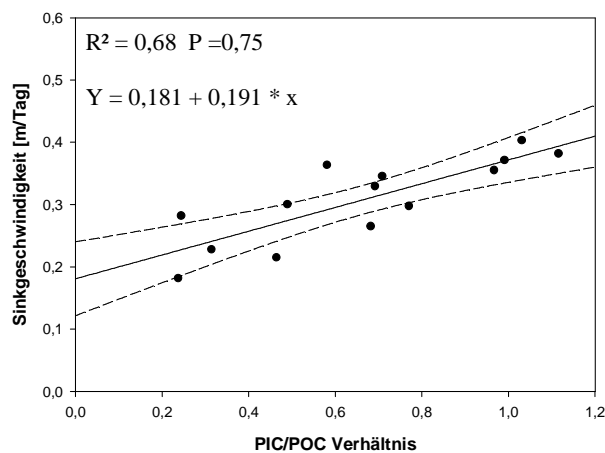


Abb. 10: Sinkgeschwindigkeit von Coccolithophoriden-Zellen (*Emiliana huxleyi*) in Abhängigkeit vom PIC/POC-Verhältnis. Jeder Punkt stellt die mittlere Sinkgeschwindigkeit der Zellen in einer Kultur mit gegebenem PIC/POC-Verhältnis dar. R² und die Geradengleichung der linearen Regression (schwarze Linie) in einem 95%-igen Konfidenzintervall (gestrichelte Linie) sowie P für den Normalitätstest (Shapiro-Wilk) sind oben links angegeben.

4. Diskussion

4.1 Größenmessungen

4.1.1 Messung von Größenstandards

Nach dem Funktionsprinzip der FlowCam (siehe 1.3.2) werden Partikel optisch vergrößert und das Abbild des Partikels wird anschließend digitalisiert. Das digitale Abbild eines Partikels wird automatisch vermessen und der Durchmesser des Partikels errechnet (Brown, 2008). Die digitale Auflösung (Anzahl der Pixel) der Kamera ist immer gleich. Mit geringerer Vergrößerung erhöht sich die Fläche eines Pixels. Die kleinste Maßeinheit der FlowCam ist ein Pixel. Die Messgenauigkeit der FlowCam wird also von der verwendeten optischen Vergrößerung bestimmt. Beispielsweise beträgt die Größe eines Pixels $0,36 \text{ } [\mu\text{m}]$ bei 20-facher optischer Vergrößerung und $1,64 \text{ } [\mu\text{m}]$ bei 4-facher Vergrößerung.

Bei der Durchlichtmikroskopie wird die Messgenauigkeit von der optischen Vergrößerung und der Auflösung der Messskala bestimmt. Mit kleinerer Vergrößerung wird der Abstand von zwei Teilstrichen der Messskala größer. Die Vermessung von Partikeln ist also ungenauer, wenn eine kleinere optische Vergrößerung gewählt wird. Dies zeigt sich im Vergleich der mit unterschiedlichen optischen Vergrößerungen bestimmten Abweichungen des gemessenen Durchmessers vom Standard. Beispielsweise ist die Abweichung der gemessenen Größe eines Standards von der nominellen Größe bei 20-facher optischer Vergrößerung größer als bei 4-facher Vergrößerung und bei 1000-facher Vergrößerung größer als bei 400-facher optischer Vergrößerung (Tab. 1).

Wie akkurat Partikel vermessen werden ist auch von der Anzahl der Maßeinheiten, die die Größe eines Partikels definieren, abhängig. Je größer bei der FlowCam die Anzahl der Pixel ist, die ein Partikel abbilden, desto detaillierter ist sein Abbild (Brown, 2008). Je größer beim Durchlichtmikroskop die Anzahl an Teilstrichen über dem zu messenden Objekt ist, desto akkurater lässt sich die Größe bestimmen. Da sich die Größe des Objekts aus der Anzahl an Teilstrichen über dem Objekt und dem Abstand zwischen zwei Teilstrichen ergibt, fallen Ungenauigkeiten, die aus

möglichen Fehlern bei der Zählung der Teilstriche resultieren, bei kleinen Objekten stärker ins Gewicht als bei größeren Objekten. Folglich werden größere Partikel bei gleicher optischer Vergrößerung akkurater vermessen als kleine. Das spiegelt sich vor allem in der für das Durchlichtmikroskop bestimmten Abweichung vom 20 μ m-Standard wider. Die Abweichung von der nominellen Größe des Standards ist bei gleicher optischer Vergrößerung zehnmal so groß wie die Abweichung der gemessenen Größe vom 50 μ m-Standard (Tab. 1).

Die optische Auflösungsgrenze eines Lichtmikroskops beträgt ca. 0,3 [μ m]. Die Auflösung ist nicht nur durch die Qualität des verwendeten Gerätes limitiert, sondern wird vor allem von physikalischen Gesetzen bestimmt (z.B. Lichtbeugung). Die maximale Auflösung eines Lichtmikroskops ergibt sich aus der numerischen Apertur und der Wellenlänge des verwendeten Lichts (Abbesche Auflösungsgrenze). Die Messgenauigkeit für die Vermessung von Partikeln ist jedoch vom verwendeten Objektiv und Messokular abhängig. Bei der Durchlichtmikroskopie könnte mit Verwendung sehr feiner Messskalen aufgrund der optischen Auflösungsgrenze eine maximale Messgenauigkeit von ca. $\pm 0,3$ [μ m] erzielt werden. Um eine maximale Messgenauigkeit zu erzielen, wird immer die größtmögliche Vergrößerung des verwendeten Mikroskops gewählt, sofern die Größe des Abbildes der Partikel die Grenzen der Messskala des Okulars nicht überschreitet. Das zu untersuchende Partikel wird präzise fokussiert, da eine unzureichende Einstellung der Optik des Mikroskops zu fehlerhaften Abbildern und damit auch fehlerhaften Vermessungen der Partikel führt.

Die Genauigkeit der Vermessung von Partikeln bei größtmöglicher optischer Vergrößerung mit der FlowCam ($\pm 0,36$ [μ m]) entspricht ungefähr der des Lichtmikroskops. Im Gegensatz zur Lichtmikroskopie besteht für den Benutzer der FlowCam jedoch nicht die Möglichkeit, den Fokus der Optik an jedes einzelne Partikel anzupassen. Die Optik der FlowCam muss vor der Messung auf eine Fokusebene eingestellt werden. Partikel, die außerhalb der Fokusebene liegen, erscheinen unscharf. Ihre Größe wird von der FlowCam falsch eingeschätzt.

Vor jeder Messung wird die digitale Kamera automatisch an die im erfassten Bereich herrschenden Lichtverhältnisse angepasst. So erkennt die elektronische Einheit der FlowCam die Veränderung eines Pixels gegenüber dem Hintergrund und ordnet dieses Pixel einem Partikel zu. Veränderungen der Fokusebene während einer Messung führen zu Veränderungen der Lichtverhältnisse im erfassten Bereich und die FlowCam liefert keine zuverlässigen Daten mehr. Um größtmögliche Messgenauigkeiten zu erzielen, sollte wie bei der Lichtmikroskopie auch bei der FlowCam die maximal mögliche optische Vergrößerung gewählt werden. Mit erhöhter Vergrößerung verringert sich jedoch die Tiefenschärfe der Fokusebene. Je kleiner die zu untersuchenden Partikel sind, desto größer wird die Anzahl der unscharf aufgezeichneten Partikel. Außerdem kann der von der Kamera erfasste Bereich, der dem Sichtfeld eines Lichtmikroskops entspricht, nicht verschoben werden. So werden bei der Vermessung durch die FlowCam auch Partikel dokumentiert, die nur zu Teilen im erfassten Bereich erscheinen. Dies führt zu Fehlinterpretationen der Größe dieser Partikel.

Um möglichst präzise und akkurate Daten zur Größe der zu untersuchenden Partikel zu erhalten, müssen nach einer Messung unscharf bzw. nur teilweise aufgezeichnete Partikel von der Messung ausgeschlossen werden. Unscharf aufgezeichnete Partikel können mit Hilfe des Parameters *edge gradient* automatisch selektiert werden. Der *edge gradient* ist ein Maß für den Kontrast zwischen der äußeren Grenze des Partikels und dem Hintergrundbild. Der Parameter *aspect ratio* gibt das Verhältnis von Länge zu Breite des Partikels an. Jedoch ist nicht ersichtlich, ob es sich bei einer *aspect ratio* von z.B. < 1 um ein teilweise aufgezeichnetes kugelförmiges Partikel oder ein fusiformes Partikel handelt. Teilweise aufgezeichnete Partikel müssen also manuell anhand der aufgenommenen Bilder von der Messung ausgeschlossen werden.

Die Vermessung von Partikeln mit der FlowCam ist unpräziser (maximal $\pm 0,32$ [μm]) als eine Vermessung mit dem Coulter Counter ($\pm 0,001$ [μm]). Dies spiegelt sich in den geringeren Schwankungen um den gemessenen mittleren Durchmesser von Mikrosphären in den Messergebnissen des Coulter Counters im Vergleich zur FlowCam wider. Beispielsweise ist die Schwankung um den gemes-

senen mittleren Durchmesser von 20µm-Mikrosphären beim Coulter Counter mit $\pm 1,7$ [%] kleiner als bei der FlowCam ($\pm 2,9$ [%]) (siehe 3.1.1). Die Abweichung von der nominellen Größe der Mikrosphären ist allerdings beim Coulter Counter für alle verwendeten Mikrosphären größer (7 bis 9 [%]) als bei der FlowCam (0,5 bis 3,3 [%]) (Tab. 1). Damit ist die Vermessung von Partikeln mit der FlowCam akkurater als mit dem Coulter Counter. Da der Coulter Counter die Größe eines Partikels nicht direkt misst, sondern anhand der Änderung des elektrischen Widerstands errechnet, können aufgrund verschiedener Leitfähigkeiten der untersuchten Mikrosphären und der verwendeten Standardpartikel (z.B. Mikrosphären) systematische Abweichungen von der tatsächlichen Größe der Mikrosphären entstanden sein. Im Gegensatz zum Coulter Counter misst die FlowCam Partikelgrößen optisch und daher unabhängig von ihren physikalischen und elektrochemischen Eigenschaften. Daher ist für den Coulter Counter eine spezifisch an die Partikeleigenschaften angepasste Kalibrierung zu empfehlen, während die FlowCam verschiedene Partikel unabhängig von ihren spezifischen Eigenschaften vermessen kann.

4.1.2 Vermessung von Coccolithophoriden (*Emiliana huxleyi*)

Bei der Vermessung von Coccolithophoriden-Zellen (*Emiliana huxleyi*) in Reinkultur liefert der Coulter Counter im Vergleich zur FlowCam und zur Durchlichtmikroskopie die kleinsten Absolutwerte (Tab. 2). Die Abweichung der mit dem Coulter Counter ermittelten Zellgröße (6,32 [µm]) von der optisch ermittelten Zellgröße (7,14 bzw. 8,96 [µm]) (Tab. 2) kann durch unterschiedliche Leitfähigkeiten der vermessenen Zellen und der verwendeten Standardpartikel (Mikrosphären) entstanden sein (siehe oben).

In einer Reinkultur von Coccolithophoriden sind die Kalkplättchen (Lithen) nicht ausschließlich auf der Zelloberfläche zu finden, sondern kommen auch frei als einzelne Lithen vor. Da die freien Lithen kleiner sind als die Zellen würden sie bei der Bestimmung der mittleren Zellgröße zu einer Unterschätzung führen. Außerdem kommen die Zellen in einer Kultur nicht ausschließlich einzeln vor, sondern können auch aggregiert sein. Solche Zellaggregate würden bei der Vermessung zu einer Überschätzung der mittleren Zellgröße führen. Freie Lithen und Zellaggregate

müssen also von der Messung ausgeschlossen werden. Durch die Einstellung des in die Berechnung der mittleren Zellgröße einfließenden Größenbereichs kann der Einfluss von freien Lithen und Zellaggregaten auf die Messung minimiert werden. Das Größenspektrum von freien Lithen bzw. Zellaggregaten kann sich jedoch mit dem Größenspektrum einzelner Zellen überschneiden. Somit können Fehleinschätzungen der mittleren Zellgröße nicht völlig ausgeschlossen werden.

Bei dem für die Messung mit dem Coulter Counter gewählten Größenbereich (2,3 bis 7,5 μm) können also in der Kultur vorkommende freie Lithen in die Berechnung der mittleren Zellgröße einbezogen sein. Außerdem werden möglicherweise in der Kultur vorkommende Zellen von einer Größe über 7,5 μm von der Berechnung ausgeschlossen. Beides kann zu einer Unterschätzung der mittleren Zellgröße geführt haben.

Die Standardabweichung von der mittleren Größe der Coccolithophoriden-Zellen (Tab. 2) ist bei der Bestimmung mit Hilfe des Durchlichtmikroskops kleiner als der Abstand zwischen zwei Teilstrichen des Messokulars bei maximaler Vergrößerung. Auch unter Verwendung feinerer Messskalen kann die Präzision des Coulter Counters ($\pm 0,001$ μm) nicht erzielt werden. Trotz genauem Fokussieren erscheinen die Grenzen der zu vermessenden Zellen aufgrund der optischen Auflösungsgrenze des Mikroskops unklar. So kann je nach Interpretation der Abbilder die Zellgröße systematisch unterschätzt bzw. überschätzt werden. Dies könnte den im Vergleich zur FlowCam (7,14 μm) höheren Wert der mit dem Durchlichtmikroskop gemessenen mittleren Zellgröße von *Emiliana huxleyi* (8,96 μm) (Tab. 2, Abb. 2) erklären.

Die Vermessung der Zellen von *Emiliana huxleyi* mit Hilfe der FlowCam bei maximaler optischer Vergrößerung ist präziser ($\pm 0,32$ μm) als die Vermessung mit dem Durchlichtmikroskop bei maximaler optischer Vergrößerung und verwendetem Messokular ($\pm 1,14$ μm). Im Vergleich zum Coulter Counter ist die Vermessung mit der FlowCam unpräziser (siehe oben). Jedoch besteht für den Benutzer sowohl bei der Verwendung der FlowCam als auch bei der Durchlichtmikroskopie die Möglichkeit, bei der Vermessung einzelne Zellen zu selektieren. Somit können in der Probe möglicherweise vorkommende freie Lithen oder Zellaggregate und

daraus resultierende systematische Abweichungen bei der Berechnung der mittleren Zellgröße für diese Methoden gänzlich ausgeschlossen werden. Bei der Vermessung mit dem Durchlichtmikroskop werden ausschließlich einzelne Zellen manuell vermessen, was je nach Stichprobenumfang und Anzahl der zu untersuchenden Proben viel Zeit in Anspruch nehmen kann. Bei der FlowCam können einzelne Zellen anhand der aufgezeichneten Bilder manuell selektiert werden. Die Betrachtung aller Bilder stellt je nach Umfang des erstellten Datensatzes allerdings einen beträchtlichen Zeitaufwand dar. Die automatische Selektion einzelner Zellen über Parameter wie z.B. *aspect ratio* oder über Größenfilter kann zu Ungenauigkeiten in der mittleren Zellgröße führen (siehe oben). Die automatische Selektion einzelner Zellen mit einer anschließenden manuellen Überprüfung stellt einen Kompromiss zwischen Zeitaufwand und Genauigkeit dar. Systematische Abweichungen, die beim Coulter Counter durch verschiedene Leitfähigkeiten unterschiedlicher Partikel entstehen können, haben bei der FlowCam und bei der Durchlichtmikroskopie ebenfalls keinen Einfluss auf die Messung.

Die FlowCam bietet die Möglichkeit, Coccolithophoriden-Zellen (*Emiliania huxleyi*) akkurat zu vermessen. Die Präzision bei der Vermessung ist jedoch kleiner als bei der Coulter-Methode. So können Variationen der Zellgröße in der *Emiliania huxleyi*-Reinkultur mit dem Coulter Counter am besten bestimmt werden (siehe Tab. 2). Die FlowCam bietet den Vorteil, dass einzelne Zellen nach der Messung mit Hilfe der Software selektiert werden können, aber alle in der Probe vorkommenden Partikel erfasst werden. Somit erhält der Benutzer neben Daten im Bezug auf die Größe einzelner Zellen auch Informationen über freie Lithen und Zellaggregate. Außerdem werden bei der Vermessung mit Hilfe der FlowCam neben dem Zelldurchmesser weitere Parameter (z.B. Länge, Breite, *aspect ratio*, Volumen) im Bezug auf die Zellgröße bestimmt. Mit der FlowCam wie auch mit dem Durchlichtmikroskop können also mehr Größencharakteristika von Partikeln bestimmt werden als mit dem Coulter Counter, der aufgrund seiner Funktionsweise (siehe 1.3.1) nur einen Größenparameter liefert.

Die Bestimmung mehrerer Größenparameter ist vor allem bei der Vermessung von nicht kugelförmigen Partikeln von Bedeutung. Mit dem Durchlichtmikroskop lassen

sich bei der Vermessung von z.B. fusiformen Partikeln die Länge und Breite des Partikels separat messen. Länge und Breite beschreiben die Größe fusiformer Partikel besser als nur eine Größe. Die FlowCam liefert bei der Vermessung von Partikeln mehrere Parameter, die die Größe des Partikels beschreiben. Neben der Länge und der Breite werden Partikelgrößen immer auch als äquivalenter sphärischer Durchmesser (ESD) sowie als flächenbasierter Durchmesser (ABD) ausgegeben. So kann bei der FlowCam je nach Form der zu vermessenden Partikel der Parameter gewählt werden, der die Größe am besten beschreibt.

4.1.3 Volumina von Phytoplankton-Zellen

Die Bestimmung mehrerer Größenparameter von Phytoplankton-Zellen bietet die Möglichkeit, Informationen über die Biomasse (z.B. Kohlenstoffgehalt) der Zellen zu erhalten. Der Kohlenstoffgehalt einer Phytoplankton-Zelle lässt sich anhand des Volumens der Zelle berechnen (Menden-Deuer und Lessard, 2000). Wird eine Zelle mit dem Durchlichtmikroskop vermessen, lässt sich anschließend das Volumen der Zelle anhand der gemessenen Größenparameter (z.B. Länge, Breite, Durchmesser) und der geometrischen Form der Zelle errechnen (Hillebran et al., 1999).

Bei der FlowCam wird das Volumen einer Zelle automatisch berechnet. Der Berechnung des Volumens liegt hier entweder der äquivalente sphärische Durchmesser (ESD) oder der flächenbasierte Durchmesser (ABD), also die zweidimensionale Ausdehnung der Zelle zugrunde. Die dreidimensionale Ausdehnung der Zelle wird theoretisch berechnet. Für kugelförmige Zellen eignet sich das ESD-Volumen. Nicht kugelförmige Zellen werden mit dem ABD-Volumen besser beschrieben.

Der Vergleich der mit der FlowCam bestimmten mittleren Volumina verschiedener Gattungen von Diatomeen mit anhand von Vermessungen mit dem Durchlichtmikroskop ermittelten Zellvolumina liefert sehr unterschiedliche Ergebnisse für die verschiedenen Gattungen.

Das mittlere Zellvolumen von *Rhizosolenia sp.* ist bei der Berechnung durch die FlowCam 38,75 [%] größer als die mit Hilfe des Durchlichtmikroskops ermittelten Werte (Tab. 3). Durch die theoretischen Annahmen der dreidimensionalen Ausdehnung durch die FlowCam können Abweichungen von der tatsächlichen dreidimensionalen Ausdehnung der Zellen entstanden sein. Bei der Bestimmung des Zellvolumens mit dem Durchlichtmikroskop fließt die konkrete dreidimensionale Form der Zelle in die Berechnung ein (siehe oben).

Des Weiteren kann ein von der FlowCam unscharf aufgezeichnetes Abbild der Zelle dazu führen, dass die durch die Zelle bedeckte Fläche falsch eingeschätzt wird (siehe 4.1.1). Damit wird auch das Volumen der Zelle falsch eingeschätzt. Mit dem Durchlichtmikroskop kann jede Zelle präzise fokussiert werden.

Das mittlere Volumen von *Chaetoceros sp.* bzw. *Thalassionema sp.* ist bei der Bestimmung mit der FlowCam für *Chaetoceros sp.* 482-mal und für *Thalassionema sp.* 112-mal so groß wie bei der Bestimmung mit Hilfe des Durchlichtmikroskops (Tab. 3).

Mit dem Durchlichtmikroskop können Zellen, die miteinander verbunden eine Kette bilden, einzeln manuell vermessen und ihr Volumen bestimmt werden. Mit der FlowCam können Zellen, die direkt aneinander liegen, nicht getrennt aufgezeichnet werden, sondern nur als ganze Kette. In diesem Fall ist das von der FlowCam berechnete Volumen das Volumen vieler Zellen. Hat eine Kette von Diatomeen-Zellen eine lineare Form, kann das Volumen jeder einzelnen Zelle anhand der Länge der Kette nur manuell berechnet werden, wenn die mittlere Größe der einzelnen Zellen und ihr Abstand in der Kette bekannt sind. Hat eine Kette von Diatomeen-Zellen eine gebogene oder spiralförmige Form (z.B. *Chaetoceros debilis*), muss auch die Länge jeder Kette manuell berechnet werden. Die Orientierung einer Kette in der Küvette der FlowCam ist bei der Aufzeichnung nicht immer gleich. So kann z.B. bei einer diagonalen Aufsicht auf die Kette ihre Länge nicht akkurat bestimmt werden.

Das mit der FlowCam bestimmte Volumen von *Chaetoceros sp.* weicht wesentlich stärker von dem mit dem Durchlichtmikroskop bestimmten Volumen ab (482-mal so groß) als bei *Thalassionema sp.* (112-mal so groß) (Tab. 3).

Bei *Chaetoceros sp.* werden die Setae der Zellen von der FlowCam als Teil des Partikels aufgezeichnet und fließen in die Berechnung des Volumens mit ein. Dadurch wird das Volumen der Partikel im Vergleich zum tatsächlichen Zellvolumen noch höher eingeschätzt als bei *Thalassionema sp.*, die keine Setae besitzen.

Die Bestimmung von Zellvolumina mit dem Durchlichtmikroskop ist wesentlich akkurater als mit der FlowCam.

4.2 Automatische Identifizierung von Phytoplankton-Partikeln

Bei der Auswertung von mit der FlowCam erstellten Datensätzen besteht die Möglichkeit, Partikel, von denen zuvor eine Bibliothek angelegt wurde, automatisch zu identifizieren. Die Bibliotheken sind Verzeichnisse, in denen aufgezeichnete Partikel derselben Kategorie (z.B. eine Gattung von Diatomeen) mit den dazugehörigen gemessenen Charakteristika (z.B. Länge, Breite, *aspect ratio*) zusammengefasst werden. Damit eine Bibliothek die Eigenschaften einer Kategorie von Partikeln ausreichend gut repräsentiert, muss eine Bibliothek aus mindesten 400 Partikeln derselben Kategorie bestehen („The FlowCam Manual“). Wird ein Datensatz mit Hilfe einer Bibliothek ausgewertet, werden alle in den Proben befindlichen Partikel anhand der in der Bibliothek gespeicherten Werte für die verschiedenen Charakteristika der Partikel automatisch identifiziert.

Die Überprüfung der Qualität der Bibliotheken bei der Untersuchung eines erhobenen Datensatzes liefert für verschiedene Gattungen von Diatomeen sehr unterschiedliche Ergebnisse.

In den untersuchten Proben vorhandene *Rhizosolenia sp.* wurden durch die angelegte Bibliothek zu 58 [%] erkannt und 42 [%] konnten nicht automatisch als

solche identifiziert werden (Abb. 3). Das lässt darauf schließen, dass die für *Rhizosolenia sp.* angelegte Bibliothek diese Gattung nicht ausreichend gut repräsentiert. Werden Partikel beispielsweise in verschiedenen Orientierungen oder unterschiedlichem Fokus aufgezeichnet, haben die Charakteristika, die das Partikel beschreiben, andere Werte und werden folglich durch die Bibliothek nicht automatisch erkannt. Dieser Effekt erklärt auch die für *Chaetoceros sp.* und *Thalassionema sp.* bestimmten Anteile von automatisch identifizierten Partikeln an den in den Proben vorhandenen Mengen. Bei *Thalassionema sp.* wurden 73,7 [%] der vorhandenen Partikel automatisch identifiziert, bei *Chaetoceros sp.* sogar nur 25,4 [%] (Abb. 3).

Durch die Bibliotheken automatisch identifizierte Diatomeen können irrtümlich als Zellen bzw. Ketten der entsprechenden Gattung identifiziert werden. Die manuelle Überprüfung, wie viele der automatisch identifizierten Diatomeen irrtümlich als Zellen bzw. Ketten der entsprechenden Gattung identifiziert wurden, liefert für die verschiedenen Diatomeen-Gattungen sehr unterschiedliche Ergebnisse.

Nur ein sehr kleiner Teil (2,6 [%]) der als *Rhizosolenia* automatisch identifizierten Partikel wurde fälschlich als solche erkannt (Abb. 4). Zellen der Gattung *Rhizosolenia* haben eine klare geometrische Form (annähernd zylindrisch), die zwischen Zellen derselben Gattung nur wenig variiert (Drebes et al., 2009). Die Variation der in der Bibliothek der FlowCam gespeicherten Werte für die beschreibenden Charakteristika ist damit ebenfalls gering. Somit ist die Möglichkeit der Verwechslung mit anderen Phytoplankton-Gattungen verhältnismäßig klein (2,6 [%]) (Abb. 4).

Bei *Chaetoceros sp.* wurden 41,7 [%] der automatisch identifizierten Partikel irrtümlich als solche erkannt (Abb. 4). Die geometrische Form von Ketten der Gattung *Chaetoceros* kann zwischen verschiedenen Arten variieren. Ketten können lineare, gebogene oder spiralförmige Formen annehmen (Drebes et al., 2009). Da die FlowCam die Ketten im Ganzen als ein Partikel aufzeichnet (siehe oben), können die in der Bibliothek gespeicherten Werte für die beschreibenden Charakteristika sehr unterschiedlich sein und sich mit den Werten für die Charakteristika anderer in den Proben vorkommender Partikel überschneiden. Damit besteht die Möglichkeit der

Verwechslung von Ketten der Gattung *Chaetoceros* mit anderen Partikeln. Derselbe Effekt kann auch den Anteil von irrtümlich als *Thalassionema* erkannten Partikeln (76,7 [%]) an den durch die entsprechende Bibliothek automatisch identifizierten Partikeln erklären. *Thalassionema*-Zellen können „Zick-Zack“-förmige Ketten bilden oder sich zu sternförmigen Gebilden zusammenschließen (Drebes et al., 2009).

Der Anteil automatisch identifizierter Diatomeen an den in den Proben vorhandenen Diatomeen ist kleiner (25-74 [%]) (Abb. 3) als die entsprechenden Werte (80 bis 90 [%]) für andere in früheren Studien (Buskey und Cammie, 2006) untersuchte Phytoplankton-Arten (*Karenia brevis*). Die Anteile irrtümlich identifizierter Diatomeen (42 bis 77 [%]) sind mit Ausnahme von *Rhizosolenia sp.* (2,6 [%]) größer als für *Karenia brevis* ermittelte Anteil (20 bis 50 [%]) (Buskey und Cammie, 2006).

Die geometrische Form von *Karenia brevis* ist annähernd kugelförmig. Partikel mit einfachen geometrischen Formen (z.B. kugelförmige Dinoflagellaten und zylindrische Diatomeen) scheinen also besser automatisch identifiziert werden zu können als Partikel mit komplexeren Formen (z.B. spiralförmige Diatomeenkette mit Setae, „Zick-Zack“-förmige Ketten und sternförmige Gebilde).

Die automatische Identifizierung von Diatomeen mit der FlowCam ist mit Abweichungen von bis zu 42 [%] von den in den Proben enthaltenen Mengen (Abb. 3) und Fehlern von bis zu 76,7 [%] bei der automatischen Identifizierung (Abb. 4) nicht ausreichend akkurat, um automatisch die Abundanzen von Diatomeen-Gattungen in einer Mischprobe zu bestimmen.

4.3 Bestimmungen von Partikelkonzentrationen

4.3.1 Sedimentation von Partikeln

Wird eine Probe in den Trichter der Probeneinheit der FlowCam gefüllt, sinken die zu untersuchenden Partikel abhängig von ihrem Radius, ihrer Dichte und der Dichte des umgebenden Mediums ab (Stokessches Gesetz). Sollen mit der FlowCam zur Bestimmung der Partikelkonzentration in einer Probe mehrere Messwiederholungen

durchgeführt werden, sollte für jede Einzelmessung eine Unterprobe in die Probeneinheit der FlowCam gefüllt und separat gemessen werden. Werden die wiederholten Messungen an derselben Probe nacheinander durchgeführt, verursacht das Absinken der zu untersuchenden Partikel eine mit der Zeit exponentiell abnehmende Partikelkonzentration im Trichter der Probeneinheit. Dadurch wird die Partikelkonzentration von der FlowCam von einer Messung zur nächsten immer stärker unterschätzt (Abb. 5, Abb. 6). Die Sedimentation von Partikeln in einer Probe stellt bei der Bestimmung der Partikelkonzentration mit der FlowCam also eine nicht zu vernachlässigende Fehlerquelle dar.

Um den Sedimentationseffekt innerhalb einer Messung zu minimieren, sollte der Zeitraum zwischen der Befüllung der Probeneinheit und dem Beginn der Messung möglichst klein sein. Außerdem sollte die Geschwindigkeit, mit der die Probe durch die Glasküvette gepumpt wird, möglichst groß sein, da die Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikel mit steigender Flussgeschwindigkeit der Probe verhältnismäßig kleiner wird. Zu große Flussgeschwindigkeiten können allerdings zu Bewegungsunschärfe der von der Kamera erzeugten Abbilder der Partikel führen. Das hat Fehlinterpretationen der Partikelcharakteristika (z.B. Größe) zur Folge (siehe 4.1.1). Des Weiteren kann der Sedimentationseffekt dadurch minimiert werden, dass möglichst kleine Messzeiten gewählt werden. Allerdings kann die Messzeit nur so weit herabgesetzt werden, wie innerhalb der gewählten Messzeit noch eine ausreichende Anzahl von Partikeln von der FlowCam erfasst wird, um einen für die Probe repräsentativen Stichprobenumfang zu untersuchen.

4.3.2 Aufkonzentrieren von Proben

Bei der Bestimmung der Anzahl von Partikeln in einer Probe wird die Partikelkonzentration in einem definierten Stichprobenvolumen bestimmt und anschließend die absolute Konzentration (z.B. $[n/l]$) anhand der ermittelten Werte errechnet. Wird eine zu untersuchende Probe aufkonzentriert, steigt die relative Partikelkonzentration. Damit wird das Stichprobenvolumen, das für eine repräsentative Zählung der Partikel nötig ist, kleiner. Dies kann bei sehr niedrigen absoluten Anzahlen von Partikeln in der Probe sinnvoll sein. Jedoch stellt das Aufkonzentrieren der Probe

eine zusätzliche Fehlerquelle dar. Wird z.B. der Inhalt einer Planktonprobe durch inverse Filtration aufkonzentriert, kann ein Teil des Inhalts im Sieb haften bleiben. Beispielsweise ist die mit der FlowCam gemessene Konzentration von mittels inverser Filtration aufkonzentrierten Proben zwischen 25 [%] und 52 [%] niedriger als die gemessene Konzentration von unbehandelten Proben (Abb. 7). Das Aufkonzentrieren einer zu untersuchenden Probe durch inverse Filtration sollte also möglichst vermieden werden.

4.3.3 Vergleich von Durchlichtmikroskopie und FlowCam

Bei der Bestimmung der Partikelkonzentration einer Mikrosphärensuspension konnte zwischen den Messungen mit dem Durchlichtmikroskop und der FlowCam im *scatter*-Modus kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 8). Das entspricht dem Vergleich manueller Zählungen mit Bestimmungen der Partikelkonzentration mit der FlowCam im *scatter*-Modus aus einer früheren Studie (Sieracki et al., 1998).

Die mit der FlowCam im *auto*-Modus bestimmte Partikelkonzentration der Mikrosphärensuspension ist im Mittel 30 [%] kleiner als die Werte für die Durchlichtmikroskopie und die FlowCam im *scatter*-Modus (Abb. 8). Das steht im Widerspruch zum Vergleich zwischen der Bestimmung von Partikelkonzentrationen mit einem Mikroskop und der FlowCam im *auto*-Modus in einer früheren Studie (See et al., 2005). In dieser Studie konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

Bei der Bestimmung der Partikelkonzentration mit der FlowCam im *auto*-Modus werden mit konstanter Frequenz Abbilder der durch die Küvette fließenden Probe erzeugt. Die Partikel werden anhand von Veränderungen des Hintergrundbildes erkannt. Die Frequenz der Bilderzeugung und die Flussgeschwindigkeit der Probe werden vom Benutzer eingestellt. Ist die Flussgeschwindigkeit der Probe im Verhältnis zur Frequenz der Bilderzeugung zu niedrig, können Partikel mehrfach aufgezeichnet werden, was eine Überschätzung der Partikelkonzentration zur Folge haben kann. Ist die Flussgeschwindigkeit zu hoch, können Partikel zwischen den

erzeugten Bildern „verpasst“ werden. Dies führt zu einer Unterschätzung der Partikelkonzentration. Dieser Effekt kann die im *auto*-Modus gemessene, um ca. 30 [%] niedrigere Partikelkonzentration im Vergleich zur Durchlichtmikroskopie und der Messung im *scatter*-Modus (Abb. 8) erklären.

Bei der Durchlichtmikroskopie werden alle Partikel auf einer definierten Fläche der Objektkammer gezählt. Ist das Volumen der Objektkammer bzw. des Sedimentationszylinders bekannt, kann die Partikelkonzentration berechnet werden. Durch ungleichmäßig in der Objektkammer verteilte Partikel können Fehler in der Berechnung der Partikelkonzentration entstehen. Diese Fehler können minimiert werden, indem eine möglichst große Fläche der Objektkammer untersucht wird.

Die Bestimmung der Partikelkonzentration mit der FlowCam funktioniert nach einem mit dem Durchlichtmikroskop vergleichbaren Prinzip. Die Fläche eines Bildes entspricht der digitalen Auflösung der Kamera (Anzahl der Pixel). Die Fläche eines Pixels ergibt sich aus der Kalibrierung mit Hilfe eines Größenstandards bei gegebener Vergrößerung. Die Tiefe der verwendeten Küvette wird vor der Messung in die Software der FlowCam eingegeben. Anhand der Anzahl der erzeugten Bilder wird das untersuchte Stichprobenvolumen von der FlowCam automatisch berechnet. Die Partikelkonzentration ergibt sich dann aus der Anzahl der registrierten Partikel im untersuchten Stichprobenvolumen.

Von der Kamera der FlowCam wird jedoch nur ein Teilbereich der Küvette erfasst. Für die Bestimmung der Partikelkonzentration mit der FlowCam muss also angenommen werden, dass die Partikel in der Küvette homogen über die gesamte Breite der Küvette verteilt sind.

Der erfasste Bereich kann nur durch die Verwendung anderer optischer Vergrößerungen verändert werden. Ist der von der Kamera erfasste Bereich allerdings größer als die Breite der Küvette, führt dies zu Fehleinschätzungen des Stichprobenvolumens durch die FlowCam.

Eine exakte Übereinstimmung des von der Kamera erfassten Bereiches und der Breite der verwendeten Küvette kann mit den verfügbaren Objektiven und Küvettengrößen nicht erreicht werden.

Im *auto*-Modus muss für eine akkurate Bestimmung der Konzentration ein größeres Stichprobenvolumen gewählt werden als im *scatter*-Modus, da nicht jeder Partikel, der den von der Kamera erfassten Bereich passiert, zwingend aufgezeichnet wird.

Die Flussgeschwindigkeit der Probe in der Küvette sollte möglichst hoch sein, jedoch ist dabei zu berücksichtigen, dass bei zu hohen Flussgeschwindigkeiten die Bewegungsunschärfe der erzeugten Bilder zu Fehlern in der Vermessung der Partikel führt. Um die Partikelkonzentration mit der FlowCam im *auto*-Modus möglichst genau zu bestimmen, müsste also die Frequenz der Bilderzeugung optimal an die Flussgeschwindigkeit der Probe angepasst werden.

Bei niedrigen Partikelkonzentrationen (1 Partikel pro Bild) lässt sich anhand eines Testdurchlaufs erkennen, ob das im erfassten Bereich befindliche Partikel mehrmals aufgezeichnet wird. Dann kann die Bildrate so lang herabgesetzt werden, bis das Partikel nur noch einmal aufgezeichnet wird. Die Bildrate kann zwischen 7 und 12 [Bilder/sec] in Schritten von 1 [Bild/sec] herauf- oder herabgesetzt werden. Die Einstellung der Bildrate während eines Testdurchlaufs ist nicht möglich. Nach jeder Veränderung der Bildrate müsste ein neuer Testdurchlauf gestartet werden.

Bei höheren Partikelkonzentrationen (2 oder mehr Partikel pro Bild) lässt sich bei sich ähnelnden Partikeln nicht erkennen, ob ein Partikel mehrmals aufgezeichnet wird. Die Optimierung der Bildrate im *auto*-Modus könnte dann nur über Testmessungen und einen Vergleich mit Ergebnissen aus Messungen mit der FlowCam im *scatter*-Modus oder andere Methoden zur Bestimmung der Partikelkonzentration erreicht werden.

Bei Messungen mit der FlowCam im *scatter*-Modus wird ein Partikel aufgezeichnet, wenn er den Laserstrahl passiert und dadurch eine Störung des Strahls verursacht, welche vom Streuungsdetektor registriert wird. Würden ausschließlich

Bilder erzeugt, wenn ein Partikel erkannt wird, würden nur Stichproben (Bilder) selektiert, die Partikel enthalten, und die Partikelkonzentration würde falsch eingeschätzt. Deshalb werden im *scatter*-Modus zusätzlich Bilder mit einer konstanten Frequenz von 1,57 [Bilder/sec] erzeugt.

4.4 Bestimmung der Sinkgeschwindigkeit von Coccolithophoriden (*Emiliana huxleyi*)

Die Sinkgeschwindigkeit von Coccolithophoriden-Zellen (*Emiliana huxleyi*) gleicher Größe ist von der Menge der Lithen abhängig, die eine Zelle umschließen. Nackte Zellen sinken 0,03 [m/Tag] langsamer als Zellen derselben Größe, die Lithen tragen (Paasche, 2002). Die Menge an Lithen kann in einer Reinkultur von Coccolithophoriden als partikulärer anorganischer Kohlenstoff (PIC) ausgedrückt werden. Die Biomasse der Zellen kann als partikulärer organischer Kohlenstoff (POC) ausgedrückt werden. Das Verhältnis von PIC zu POC ist in einer Reinkultur von Coccolithophoriden also ein Maß für die Menge an Lithen, die von den Zellen gebildet werden.

Die mit der FlowCam gemessene Sinkgeschwindigkeit von *Emiliana huxleyi* steigt proportional mit steigendem PIC/POC-Verhältnis. Bei einem Anstieg des PIC/POC-Verhältnisses von 1,0 erhöht sich die Sinkgeschwindigkeit der Zellen um 0,19 [m/Tag] (Abb. 10).

Mit steigender CO₂-Konzentration sinkt das Verhältnis von partikulärem anorganischen Kohlenstoff (PIC) zu partikulärem organischem Kohlenstoff (POC) (Zondervan, Rost und Riebesell, 2002; Mueller, Schulz und Riebesell, 2010). Damit wird auch die Sinkgeschwindigkeit von *Emiliana huxleyi* mit steigender CO₂-Konzentration kleiner. Die Sinkgeschwindigkeit nimmt bei einem Anstieg der CO₂-Konzentration von ca. 1000 [ppm] um 0,16 [m/Tag] ab (Abb. 9).

Die mit Hilfe der FlowCam gemessenen Sinkgeschwindigkeiten von *Emiliana huxleyi* (0,18 bis 0,38 [m/Tag]) (Abb. 10) liegen in einem ähnlichen Bereich wie anhand von Berechnungen mit dem Stokesschen Gesetz ermittelte Sinkgeschwin-

digkeiten von *Emiliana huxleyi* (0,19 bis 0,26 [m/Tag]) aus früheren Studien (Paasche, 2002). Die Messung der Sinkgeschwindigkeit von *Emiliana huxleyi* mit der FlowCam liefert also realistische Daten.

Bei der Bestimmung der Sinkgeschwindigkeit mit der FlowCam wird sich die Möglichkeit zu Nutze gemacht, dass sich eine Probe mit einer konstanten Bildrate der Kamera (*auto*-Modus) aufzeichnen lässt. Füllt man eine Probe in die Proben-einheit, sinken die Partikel innerhalb des Trichters und der Küvette ab (Abb. 5, Abb. 6). Wird die Küvette nicht an die Pumpe angeschlossen und somit ein Fluss der Probe in der Küvette verhindert, sinken die Partikel in der Probe mit ihrer spezifischen Sinkgeschwindigkeit. Die sinkenden Partikel werden dann von der Kamera mit einer konstanten Bildrate (z.B. 1 [Bild/sec]) aufgezeichnet. Der abgebildete Bereich wird dabei von der FlowCam als XY-Koordinatensystem verstanden. Die Ausdehnung des Koordinatensystems entspricht der digitalen Auflösung der Kamera (1024 * 768 [Pixel]). Zu jedem der von der FlowCam aufgezeichneten Bilder eines Partikels wird der Punkt im abgebildeten Bereich, an dem sich das Zentrum des Partikels bei der Aufzeichnung befindet, gespeichert. Gleichzeitig wird der genaue Zeitpunkt ($\pm 0,001$ [sec]) der Aufzeichnung des Partikels gespeichert. Anhand der Differenz der Punkte auf der Y-Achse (Anzahl der Pixel) des Koordinatensystems (abgebildeter Bereich) zu verschiedenen Aufzeichnungszeitpunkten und mit Hilfe der Kalibrierungskonstanten bei gegebener Vergrößerung (gibt die Größe eines Pixels in μm) an) lässt sich die vom Partikel beim Absinken zurückgelegte Strecke berechnen.

Beispiel:

$$D = 10 \text{ [Pixelnr.]} - 510 \text{ [Pixelnr.]} * 0,36 \text{ } [\mu\text{m}] = \underline{180 \text{ } [\mu\text{m}]}$$

Die für diese Strecke benötigte Zeit ergibt sich aus der Differenz der Aufzeichnungszeitpunkte.

Beispiel:

$$T = 12 \text{ [h]} 30 \text{ [min]} 1,000 \text{ [sec]} - 12 \text{ [h]} 30 \text{ [min]} 11,000 \text{ [sec]} = \underline{10 \text{ [sec]}}$$

Die Sinkgeschwindigkeit des Partikels ist dann die pro Zeit zurückgelegte Strecke.

Beispiel:

$$V = D / T = 180 \text{ [}\mu\text{m]} / 10 \text{ [sec]} = \underline{18 \text{ [}\mu\text{m/sec]}}$$

Die Bestimmung der Sinkgeschwindigkeit von Partikeln mit der FlowCam bietet den Vorteil, dass die Ergebnisse von möglicherweise variierenden Dichten von Partikeln gleicher Größe nicht beeinflusst werden. Bei der Berechnung der Sinkgeschwindigkeit mit dem Stokesschen Gesetz fließt die Dichte der Partikel in die Berechnung mit ein. Mit der FlowCam kann die Sinkgeschwindigkeit jedes einzelnen Partikels in einer Probe bestimmt werden. So können Variationen der Sinkgeschwindigkeit innerhalb einer Probe ermittelt werden.

Anmerkung:

Stehen Zellen während des Absinkens in der Küvette mit der Küvettenwand in Kontakt, kann die Sinkgeschwindigkeit durch Adhäsion verringert sein. Bei der Auswertung der Messungen müssen Zellen, die mit der Küvettenwand in Kontakt standen, ausgeschlossen werden. Bei einer Fokussierung der Optik auf die Mitte der Küvette liegen Zellen, die sich in der Nähe der Küvettenwand befinden außerhalb der Fokusebene und werden unscharf aufgezeichnet. Über den Parameter *edge gradient* lassen sich diese Zellen dann aussortieren.

Die Messung der Sinkgeschwindigkeiten von Zellen in einer Probe nimmt je nach der Konzentration an Zellen ca. 15 bis 20 Minuten in Anspruch. Die manuelle Auswertung der erhobenen Daten mit einem gängigen Datenverarbeitungsprogramm ist allerdings sehr zeitintensiv. Ohne Berücksichtigung der Entwicklung des Auswertungsprozesses wurden zur Auswertung der Daten aus 14 Proben ca. 30 Arbeitsstunden benötigt. Durch die Implementierung eines Algorithmus in einem Programm, der für die mit der FlowCam erhobenen Daten zur Sinkgeschwindigkeit spezifisch ist, könnte man den Zeitaufwand enorm minimieren.

5. Literaturverzeichnis

ANTOINE, D., ANDRE, J.-M. und MOREL, A. (1996). Oceanic primary production: 2. Estimation at global scale from satellite (Coastal Zone Color Scanner) chlorophyll. *Global Biogeochemical Cycles* 10: 57–69.

BIERMANN, A. und ENGEL, A. (2010). Effect of CO₂ on the properties and sinking velocity of aggregates of the coccolithophore *Emiliana huxleyi*. *Biogeosciences* 7: 1017–1029.

BROWN, C.J., und andere (2010). Effects of climate-driven primary production change on marine food webs: implications for fisheries and conservation. *Global Change Biology* 16: 1194–1212.

BROWN, L. (2008). Particle Image Understanding – A Primer [online]. Verfügbar unter: <http://fluidimaging.com/pictures>. Dateiname: Resolution_White_Paper_200ppi.pdf

BUSALACCHI, A.J. (2004). The role of the Southern Ocean in global processes: an earth system science approach. *Antarctic Science* 16: 363–368

BUSKEY, E.J., und CAMMIE, J.H. (2006). Use of the FlowCAM for semi-automated recognition and enumeration of red tide cells (*Karenia brevis*) in natural plankton samples. *Harmful Algae* 5: 685–692.

COULTER, W.H. (1957). High speed automatic blood cell counter and cell size analyzer. *Proc. National Electronic Conference* 12: 1034–1042.

DREBES, G., HOPPENRATH, M. und ELBRÄCHTER, M. (2009). Marine Phytoplankton, Selected microphytoplankton species from the North Sea around Helgoland and Sylt. E. Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Kleine Senckenberg-Reihe 49, ISBN 978-3-510-61392-2.

ENGEL, A., SCHULZ, K.G., RIEBESELL, U., BELLERBY, R., DELILLE, B. und SCHARTAU, M. (2008). Effects of CO₂ on particle size distribution and phytoplankton abundance during a mesocosm bloom experiment (PeECE II). *Biogeosciences* 5: 509–521.

FALKOWSKI, P.G., BARBER, R.T., SMETACEK, V. (1998). Biogeochemical Controls and Feedbacks on Ocean Primary Production. *Science* 281: 200 – 206.

FIELD, C.B., BEHRENFELD, M.J., RANDERSON, J.T. und FALKOWSKI, P. (1998). Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* 281: 237–240.

HILLEBRAN, H., DÜRSELEN, C.-D., KITSCHER, D., POLLINGER, U. und ZOHARY, T. (1999). Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *Journal of Phycology*. 35: 403–424.

- IDE, K., TAKAHASHI, K., KUWATA, A., NAKAMACHI, M. und SAITO, H. (2008). A rapid analysis of copepod feeding using FlowCAM. *Journal of Plankton Research* 30: 275-281.
- INDERMUEHLE, A. und andere (1999). Holocene carbon-cycle dynamics based on CO₂ trapped in ice at Taylor Dome, Antarctica. *Nature* 398: 121-126.
- KEELING, C.D. und WHORF, T.P. (2005). Atmospheric CO₂ records from sites in the SIO air sampling network. *Trends: A Compendium of Data on Global Change*. US Department of Energy, Oak Ridge, USA Tenn. Carbon Dioxide Information Analysis Center, Oak Ridge National Laboratory.
- LIU, Z., DREYBRODT, W. und WANG, H. (2010). A new direction in effective accounting for the atmospheric CO₂ budget: Considering the combined action of carbonate dissolution, the global water cycle and photosynthetic uptake of DIC by aquatic organisms. *Earth-Science Reviews* 99: 162-172.
- MENDEN-DEUER, S. und LESSARD, E.J. (2000). Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton. *Limnology and Oceanography* 45: 569-579.
- MOREIRA-TURCQ, P.F., CAUWET, G. und MARTIN, J.M. (2001). Contribution of flow cytometry to estimate picoplankton biomass in estuarine systems. *Hydrobiologia* 462: 157-168.
- MUELLER, M.N., SCHULZ, K.G. und RIEBESELL, U. (2010). Effects of long-term high CO₂ exposure on two species of coccolithophores. *Biogeosciences* 7: 1109-1116.
- PAASCHE, E. (2002). A review of the coccolithophorid *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae), with particular reference to growth, coccolith formation, and calcification-photosynthesis interactions. *Phycologia* 40: 503-529.
- PENG, L., WANG, W. und BAI, L. (2007). Performance evaluation of the Z2 coulter counter for WBC and RBC counting. *International Journal of Laboratory Hematology* 29: 361-368.
- RIEBESELL, U. (2004). Effects of CO₂ Enrichment on Marine Phytoplankton. *Journal of Oceanography* 60: 719-729.
- SIERACKI C.K., SIERACKI, M.E. und YENTSCH, C.S. (1998). An imaging-in-flow system for automated analysis of marine microplankton. *Marine Ecology Progress Series* 168: 285-296.
- SEE, J.H., CAMPBELL, L., RICHARDSON, T.L., PICKNEY, J.L. und SHEN, R. (2005). Combining new technologies for determination of Phytoplankton community structure in the northern Gulf of Mexico. *Journal of Phycology* 41: 305-310.

SMITH JR, W.O. und LANCELOT, C. (2004). Bottom-up versus top-down control in phytoplankton of the Southern Ocean. *Antarctic Science* 16: 531–539.

STERLING JR., M.C., BONNER, J.S., ERNEST, A.N.S., PAGE, C.A. und AUTENRIETH, R. L. (2004). Characterizing aquatic sediment–oil aggregates using in situ instruments. *Marine Pollution Bulletin* 48: 533-542.

VOLK, T., und HOFFERT, M.I. (1985). Ocean carbon pumps: analysis of relative strength and efficiencies of in ocean-driven circulation atmospheric CO₂ changes. In: SUNDQUIST, E.T., BROECKER, W.S. (Eds.), *The Carbon Cycle and Atmospheric CO₂: Natural Variation Archean to Present*: AGU Monograph 32. American Geophysical Union, Washington D.C., 99–110.

ZHANG, Y., und JIAO, N.Z. (2004). Method for quantification of aerobic anoxygenic phototrophic bacteria. *Chinese Science Bulletin* 49: 597-599.

ZONDERVAN, I., ROST, B. und RIEBESELL, U. (2002). Effect of CO₂ concentration on the PIC/POC ratio in the coccolithophore *Emiliana huxleyi* grown under light-limiting conditions and different daylengths. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 272: 55-70.

6. Anhang

Einstellungen des Hintergrundbildes

Tab. A: Optimale Einstellungen des von der Kamera erzeugten Hintergrundbildes bei verschiedenen optischen Vergrößerungen.

Vergrößerung	Gain	White U	White V	Shutter	Brightness	Gamma	Hue	Saturation	Sharpness	Flash Duration
2x		425	2020	1906	16	0	129	128	128	3 40
4x		525	2006	1922	16	0	129	128	128	3 45
10x		500	2011	1919	16	0	129	128	128	3 45
20x		551	2014	1917	16	0	129	128	128	3 60

Rohdaten

Tab. B: Mit dem Coulter Counter, der FlowCam und dem Durchlichtmikroskop gemessene Durchmesser von standardisierten Mikrosphären der Größen 10 [µm], 20 [µm] und 50 [µm].

Partikel	Methode	Mittlerer Durchmesser [µm]	Stand. Abw. [µm]
10µm Standard	Coulter Counter	9,313	0,25
		9,363	0,24
		9,298	0,26
		9,273	0,25
		9,24	0,26
10µm Standard	FlowCam	10,32	0,29
		10,28	0,21
		10,4	0,24
		10,3	0,24
		10,27	0,23
10µm Standard	Durchlichtmikroskop	10,26	0,00
20µm Standard	Coulter Counter	18,2	0,307
		18,21	0,309
		18,21	0,301
		18,2	0,309
		18,2	0,318
20µm Standard	FlowCam	21,09	0,34
		20,77	0,5
		19,7	0,61
		19,75	0,5
		19,9	0,57
20µm Standard	Durchlichtmikroskop	22,05	0,00
50µm Standard	Coulter Counter	45,98	0,459
		45,91	0,468
		45,92	0,485
		45,91	0,461
		45,9	0,489
50µm Standard	FlowCam	48,12	1,06
		48,17	0,97
		48,14	0,94
		48,11	1,05
		48,19	0,82
50µm Standard	Durchlichtmikroskop	49,50	0,00

Tab. C: Mit dem Coulter Counter, der FlowCam und dem Durchlichtmikroskop gemessene Durchmesser von *Emiliana huxleyi*.

Partikel	Methode	Mittlerer Durchmesser [μm]	Stand. Abw. [μm]
<i>Emiliana huxleyi</i>	Coulter Counter	6,32	0,68
		6,47	0,66
		6,31	0,68
<i>Emiliana huxleyi</i>	FlowCam	7,35	0,82
		7,14	0,86
		7,01	0,75
<i>Emiliana huxleyi</i>	Durchlichtmikroskop	8,96	0,89
		8,96	0,84
		8,88	0,79

Tab. D: Aus Messungen mit einem Durchlichtmikroskop ermittelte und mit der FlowCam gemessene mittlere Volumina dreier Diatomeen-Gattungen aus je einem Mesokosmos an 6 Tagen.

	Mittleres Volumen [μm^3]	Mittleres Volumen [μm^3]
Partikel	Durchlichtmikroskop	FlowCam
<i>Rhizosolenia sp.</i>	329097	326000
	330833	504000
	336571	333000
	335794	457000
	338130	474000
	342564	525000
<i>Chaetoceros sp.</i>	1124	190000
	989	368000
	661	214000
	397	268000
	199	308000
	185	242000
<i>Thalassionema sp.</i>	1800	72214
	1800	137000
	1800	237000
	1800	166000
	1800	250000
	1800	332000

Tab. E: Mit der FlowCam bestimmte Partikelkonzentration zu verschiedenen Messzeitpunkten von fünf aufeinander folgenden Messwiederholungen.

Partikel	Messzeit [min]	Konzentration [n/ml]
10µm Standard	17,5	9662
	35	7500
	52,5	6250
	70	4392
	87,5	3243
<i>Emiliana huxleyi</i>	10	37568
	20	30000
	30	26486
	40	15946
	50	14865

Tab. F: Mit der FlowCam bestimmte Partikelkonzentrationen einer unbehandelten und einer 5-fach konzentrierten Probe aus drei verschiedenen Mesokosmen.

Mesokosmos	Konzentration [n/ml] unbehandelt	Konzentration [n/ml] 5-fach konzentriert
1	2,92	1,85
2	4,30	3,23
3	4,23	2,01

Tab. G: Mit dem Durchlichtmikroskop und der FlowCam im *scatter*- sowie im *auto*-Modus bestimmte Partikelkonzentrationen einer Mikrosphärensuspension.

Partikel	Methode	Part./ml err.
20µm Standard	FlowCam <i>scatter</i>	9320
		9116
		7917
	FlowCam <i>auto</i>	5906
		6508
		6625
	Durchlichtmikroskop	9095
		10442
		8758

Tab. H: Anhand von Bibliotheken und manuellen Zählungen bestimmte Anzahlen von Partikeln dreier Diatomeen-Gattungen aus 6 verschiedenen Mesokosmen an 12 Tagen.

Partikel	N in Probe	N identifiziert	N korrekt identifiziert	N falsch identifiziert
<i>Rhizosolenia sp.</i>	82	69	68	1
	53	42	40	2
	75	57	51	6
	47	38	35	3
	81	58	58	0
	89	70	67	3
	49	40	38	2
	74	67	67	0
	9	7	7	0
	38	36	34	2
	83	71	69	2
	7	9	6	3
	104	85	82	3
	49	42	41	1
	199	173	169	4
	256	230	227	3
	190	174	174	0
	191	74	74	0
	275	82	81	1
	188	165	157	8
	352	310	307	3
	296	119	118	1
	360	83	82	1
	204	91	91	0
	376	90	89	1
	109	48	47	1
	125	18	18	0
<i>Chaetoceros sp.</i>	26	48	25	23
	13	51	13	38
	36	62	35	27
	14	43	14	29
	53	82	53	29
	23	69	23	46
	4	16	4	12
	62	63	58	5
	2	3	2	1
	39	53	39	14
	1	10	1	9
	95	107	88	19
	2	14	2	12
	149	169	140	29

	173	201	164	37
	244	164	114	50
	8	94	5	89
	271	277	254	23
	8	71	6	65
	2	9	1	8
	109	192	67	125
	6	94	3	91
	3	3	1	2
	159	157	75	82
	226	159	102	57
<hr/>				
<i>Thalassionema sp.</i>	6	6	6	0
	23	26	23	3
	14	18	13	5
	1	6	1	5
	6	14	6	8
	2	7	2	5
	4	5	4	1
	1	1	1	0
	5	19	5	14
	5	63	4	59
	1	7	1	6
	9	93	8	85
	2	91	1	90
	18	18	16	2
	35	23	17	6
	1	170	1	169
	35	30	24	6
	20	13	9	4
	6	3	1	2

Tab. I: Mit Hilfe der FlowCam bestimmte mittlere Sinkgeschwindigkeiten von *Emiliana huxleyi* aus 14 verschiedenen Kulturen mit verschiedenen CO₂-Konzentrationen und PIC/POC-Verhältnissen.

pCO ₂ [ppm]	PIC/POC	Mittlere Sinkgeschwindigkeit	
		[µm/sec]	
218,97	0,99	4,29	
195,64	1,12	4,41	
184,98	0,97	4,10	
267,06	1,03	4,66	
524,82	0,77	3,43	
482,50	0,68	3,06	
502,66	0,58	4,20	
482,56	0,69	3,80	
758,28	0,71	3,99	
749,31	0,32	2,63	
825,21	0,49	3,47	
894,88	0,47	2,48	
1264,32	0,25	3,25	
1286,26	0,24	2,09	